

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02859

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C12M3/00, C12N5/06, C12N11/16		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C12M3/00-3/06, C12N5/06, C12N11/16		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (DIALOG)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Takahiro Mori et al., "Parenchymal cells proliferate and differentiate in an organotypic slice culture of the neonatal liver", Anatomy and Embryology, Vol.199, No.4, pages 319 to 327, (1999)	1-23
Y	WO, 90/2796, A1 (Marrow-Tech Inc.), 22 March, 1990 (22.03.90), & AU, 8942114, A & US, 5032508, A & DK, 9100405, A	1-23
A	JP, 9-154567, A (Nippon Telegr. & Teleph. Corp. <NTT>), 17 June, 1997 (17.06.97) (Family: none)	1-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"I"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 15 June, 2001 (15.06.01)		Date of mailing of the international search report 26 June, 2001 (26.06.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

RECEIVED TIMENOV. 29. 5:42AM

PRINT TIMENOV. 29. 6:07AM



## PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 01-F-00 の書類記号 6PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO1/02859	国際出願日 (日.月.年) 02.04.01	優先日 (日.月.年) 31.03.00
出願人 (氏名又は名称) 独立行政法人 農業技術研究機構		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。





A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C12M3/00, C12N5/06, C12N11/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C12M3/00~3/06, C12N5/06, C12N11/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Takahiro Mori. et al. "parenchymal cells proliferate and differentiate in an organotypic slice culture of the neonatal liver" Anatomy and Embryology, Vol. 199, No. 4, p. 319-327 (1999)	1-23
Y	WO, 90/2796, A1 (MARROW-TECH INC) 22. 3月. 1990 (22. 03. 90) & AU, 8942114, A&US, 5032508, A&DK, 9100405, A	1-23
A	JP, 9-154567, A (日本電信電話株式会社) 17. 6月. 1997 (17. 06. 97) (ファミリーなし)	1-23

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 15. 06. 01

国際調査報告の発送日

26.06.01

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
鈴木 恵理子

4N 8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 10 月 4 日 (04.10.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/72953 A1

- (51) 国際特許分類: C12M 3/00, C12N 5/06, 11/16 千 305-0856 茨城県つくば市観音台3丁目1番地1号 Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/02859
- (22) 国際出願日: 2001 年 4 月 2 日 (02.04.2001) (71) 出願人 および (72) 発明者: 竹澤俊明 (TAKEZAWA, Toshiaki) [JP/JP]; 千 194-0211 東京都町田市相原町1806番地58 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 橋爪一善 (HASHIZUME, Kazuyoshi) [JP/JP]; 千 124-0006 東京都葛飾区堀切1-41-9-403 Tokyo (JP). 今井 敬 (IMAI, Kei) [JP/JP]; 千 305-0044 茨城県つくば市並木2-10-1-205-104 Ibaraki (JP). 高橋 透 (TAKAHASHI, Toru) [JP/JP]; 千 305-0035 茨城県つくば市松代5-15-503-402 Ibaraki (JP).
- (30) 優先権データ:  
特願2000-098401 2000 年 3 月 31 日 (31.03.2000) JP  
特願2001-101961 2001 年 3 月 30 日 (30.03.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人 農業技術研究機構 (NATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH ORGANIZATION) [JP/JP];

[続葉有]

(54) Title: CARRIER FOR ANIMAL CELL CULTURE COMPRISING ORGAN TISSUE SLICE AND ANIMAL CELL CULTURE METHOD AND TRANSPLANTATION METHOD WITH THE USE OF THE CARRIER

(54) 発明の名称: 生物の組織を薄切した切片からなる動物細胞の培養担体と、この担体を用いる動物細胞の培養方法および移植方法

(57) Abstract: A cell culture carrier comprising an organ tissue slice which is optionally adhered or adhered/extended onto a support. By using this culture carrier, culture environment closer to a vital tissue (i.e., environment having spatial and time information of the target vital tissue incorporated therein) can be provided, which enables clarification of various properties and characteristics of cells with the use of the interactions of the spatial and time information between the target cells and vital tissue, analysis of gene function with the use of the interactions, reconstruction of the tissue with the use of a template of the vital tissue and transplantation of the tissue thus reconstructed.

(57) 要約:

動物細胞を培養する担体が、生体の組織を薄切した切片からなる細胞培養担体、もしくは生物の組織を薄切した切片が、支持体に付着または付着伸展された細胞培養担体と、これを用いた培養方法並びに移植方法であり、より生体組織に近い培養環境、即ち、目的とする生体組織の場所的かつ時間的情報が組込まれた環境を提供し、目的とする細胞と、生体組織の場所的かつ時間的情報との相互作用を利用した細胞の諸性質や特性の解明、およびその相互作用を利用した遺伝子の機能解析、さらには生体組織の鋳型を利用した組織の再構築、およびその再構築組織の移植を可能とする。



(74) 代理人: 弁理士 西澤利夫(NISHIZAWA, Toshio); 添付公開書類:  
〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6F — 国際調査報告書  
Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

生物の組織を薄切した切片からなる動物細胞の培養担体と、  
この担体を用いる動物細胞の培養方法および移植方法

### 技術分野

この出願の発明は、生物の組織を薄切した切片からなる動物細胞の培養担体と、この担体を用いる動物細胞の培養方法および移植方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、培養系に於いて動物細胞に生体組織の場所的かつ時間的環境情報を提供するための培養担体と、その培養担体上での動物細胞の培養方法、およびその培養担体上で培養した細胞の移植方法に関するものであり、様々な生体組織由来の担体上で様々な細胞を培養できるので、当該担体を利用した機能細胞の培養維持、細胞の挙動や機能の評価、および生体に近い組織の再構築を可能とし、遺伝子機能の評価、培養臓器の開発、もしくは細胞移植等に有用である。

### 背景技術

培養下における動物細胞は、その培養環境を工夫することで、医薬品等の生理活性物質の開発研究やその製造手段、あるいは培養臓器の作製やその移植へと活用領域が拡大し、現代社会に貢献している。そして従来より、動物由来の機能細胞に目的とする能力を発揮させるために、動物細胞用の様々な培養担体が開発されてきている。なぜなら、培養担体の素材と形状を創意工夫することで、細胞の接着、伸展、移動、浸潤、増殖、分化、極性、自己組織化等の細胞挙動、さらには細胞と培養液の相互作用機構を制御することができるからである。

これまでの培養担体の素材は、天然物由来素材、人工素材、および天然物由来

素材と人工素材のハイブリッドに分類でき、それらの形状は、支持体への吸着体、支持体の被膜、フィルム、膜、プレート、シャーレ、フラスコ、中空糸、糸および／またはその織成体、ゲル、ビーズ、等さまざまである。天然物由来素材としては、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、あるいはマトリゲル（EHS腫瘍から抽出して再構成された基底膜；Kleinman, H. K., et al. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochem.* 25, 312, 1986.）などの動物組織から抽出した細胞外マトリックス構成成分、動物組織から調製した無細胞真皮マトリックス（Livesey, S. A., et al. Transplanted acellular allograft dermal matrix. *Transplant.* 60, 1, 1995.）、イガイ由来の接着蛋白質、絹、あるいは綿等が培養担体として開発されている。また、人工素材としては、ナイロン等の生体非吸収性の合成高分子、ポリグリコール酸等の生体吸収性の合成高分子、あるいはセラミックス等が培養担体として開発されている。

一般に、動物の初代培養細胞は、培養担体としてプラスチックシャーレを用いて培養すると、生体内で発現していた組織特異的機能を失ってしまうが、細胞外マトリックス構成成分を含有する培養担体を用いて培養すると、比較的機能が維持されること、特に培養担体としてマトリゲルを用いて上皮系細胞を培養すると、細胞は分化して組織特異的機能が向上することが知られている。また、培養担体として無細胞真皮マトリックスを用いて表皮角化細胞を培養すると、角化細胞は分化して再構築表皮を無細胞真皮マトリックス上に形成することが知られている。これらの知見は、培養細胞に組織特異的機能もしくは三次元微細構造形態を誘導するためには、元来その細胞が生体内で存在していた場所的情報を培養担体に極力正確に反映することが重要であることを示唆している。動物の生体内組織に於いては、細胞は時間経過とともに未分化な状態から終末分化した状態へと変遷し、細胞の分化状態に対応して細胞外マトリックスも刻々と変化しているので

、各々の細胞が局在している細胞外マトリックス環境も時間的支配下にある。つまり、生体内組織に於ける細胞の周囲環境は、場所的情報に加えて時間的情報も有している。

しかしながら、様々な分化状態にある細胞で構成されている生体組織の環境を反映した培養担体、つまり、生体組織の場所的かつ時間的情報を正確に反映できるような培養担体は、これまで未開発であった。

それ故、任意の動物細胞に対して生体内に酷似した細胞外環境を付与する培養システムを実現することは、不可能であった。

この出願の発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、動物細胞の培養担体として、より生体組織に近い培養環境、即ち、目的とする生体組織の場所的かつ時間的情報が組込まれた環境を、提供することを課題としている。さらに、この出願の発明は、当該培養担体上で細胞を培養することにより、目的とする細胞と、生体組織の場所的かつ時間的情報との相互作用を利用した細胞の諸性質や特性の解明、およびその相互作用を利用した遺伝子の機能解析、さらには生体組織の鋳型を利用した組織の再構築、およびその再構築組織の移植を可能とすることを課題としている。

#### 発明の開示

この出願の発明は、培養系に於いて動物細胞に生体組織の場所的かつ時間的環境情報を提供するために、通常は組織学や病理学の分野で顕微鏡観察の目的で調製される生体組織の薄切切片を、直接もしくは無細胞化するなどの処理を施した後に、培養担体として用いる方法を見出した。そこで、この出願の発明は、第1には生物の組織を薄切した切片からなる動物細胞の培養担体を提供し、さらに、第2には、生物の組織を薄切した切片が、支持体に付着または付着伸展している細胞培養担体を、第3には、支持体が、ガラス、プラスチック、ゴム、金属、天

然または合成の糸および／またはその織成体、および生体吸収性材料から選ばれる１種以上である細胞培養担体を、第４には支持体には予め切片の付着または付着伸展を促進する処理が施されている細胞培養担体を提供する。

また、この出願の発明は、第５には、生物の組織が、新鮮な組織または予め固定液で固定した組織から調製される細胞培養担体を、第６には、薄切する前の生物の組織、または生物の組織を薄切した切片に無細胞化する処理が施されている組織から調製される細胞培養担体を、第７には、生物の組織を薄切した切片に、生理活性物質を結合できる抗体や核酸プローブの処理を施して、切片上の特定の場所に外来性の生理活性物質を導入することを特徴とする細胞培養担体を、第８には、生物の組織を薄切した切片に、酵素の処理など生物学的処理または酸やアルカリや界面活性剤の処理など化学的処理を施して、切片に於ける生物の構成成分や微細構造を改変もしくは修飾することを特徴とする細胞培養担体を、第９には、生物の組織を薄切するために、予め生物の組織が凍結または凍結包埋、パラフィン包埋、または樹脂包埋されている組織から調製される細胞培養担体を、第１０には、生物が動物または植物である細胞培養担体を、第１１には、動物が哺乳動物である組織から調製される細胞培養担体を、第１２には、生物の組織が、生前の発生段階にある動物の全身または一部である組織から調製される細胞培養担体を、第１３には、生物の組織が、生後の動物の全身または一部である細胞培養担体を提供する。

そしてこの出願の発明は、第１４には第１ないし第１３の発明のいずれかの細胞培養担体を培養容器に装入して動物細胞を培養することを特徴とする細胞培養方法を、第１５には、動物細胞の培養を開始する手段が、細胞懸濁液、細切組織片、受精卵、または三次元再構築した多細胞性凝集塊の播種によることを特徴とする細胞培養方法を、第１６には、播種した動物細胞が付着増殖して、切片または切片に由来する組織を、第２ないし第４の発明の支持体から剥離することを特



徴とする細胞培養方法を、第 17 には、支持体から剥離した後に培養を続けることで、切片または切片に由来する組織を取り込んだ三次元の多細胞性凝集塊を形成することを特徴とする細胞培養方法を、第 18 には、培養する動物細胞が、初代培養細胞、株化細胞、受精卵および／またはそれらに外来性遺伝子を導入した細胞から選ばれる 1 種または 2 種以上である細胞培養方法を、第 19 には、培養する動物細胞が、未分化な幹細胞、分化過程にある細胞、終末分化した細胞、および／または脱分化した細胞に由来することを特徴とする細胞培養方法を、第 20 には、未分化な幹細胞が、特に胚性幹細胞であることを特徴とする細胞培養方法を、第 21 には、動物細胞を培養する培養液が、血清含有の培養液または血清非含有の無血清培養液であることを特徴とする第 14 ないし第 20 の発明の細胞培養方法を、第 22 には、これらの細胞培養方法により培養した動物細胞を、動物に移植することを特徴とする細胞移植方法を、第 23 には、移植する動物が哺乳動物である細胞移植方法を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、5  $\mu$ m に薄切したウシ胎盤の凍結切片を付着伸展したスライドガラス 4 枚を、菌液トレイに装入した実体写真である。

図 2 は、5  $\mu$ m に薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体を、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ m に相当)

図 3 は、5  $\mu$ m に薄切した発情後 13 日目の未経産ウシ子宮のパラフィン切片を、付着進展した直径 35 mm のポリスチレン製の親水性培養皿の実体写真である。

図 4 は、5  $\mu$ m に薄切した発情後 13 日目の未経産ウシ子宮のパラフィン切片を、付着伸展した直径 35 mm のポリスチレン製の疎水性培養皿の実体写真であ

る。

図5は、5  $\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.01% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体を、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu\text{m}$ に相当)

図6は、5  $\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体を、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu\text{m}$ に相当)

図7は、5  $\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.5% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体を、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu\text{m}$ に相当)

図8は、5  $\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片を1.0% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体を、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu\text{m}$ に相当)

図9は、切片の付着していないスライドグラス上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu\text{m}$ に相当)

図10は、切片の付着していないスライドグラス上で、BeWo細胞を1日間培養し、calcein 蛍光発色で生存細胞を観察した蛍光顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu\text{m}$ に相当)

図11は、5  $\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu\text{m}$ に相当)

図12は、5  $\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養したcalcein蛍光発色で生存細胞を観察した蛍光顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu\text{m}$ に相当)

図13は、5  $\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞

胞化した細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図14は、5  $\mu$ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養し、calcein蛍光発色で生存細胞を観察した蛍光顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図15は、切片の付着していないスライドグラス上で、BeWo細胞を4日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図16は、切片の付着していないスライドグラス上で、BeWo細胞を4日間培養し、calcein 蛍光発色で生存細胞を観察した蛍光顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図17は、5  $\mu$ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、BeWo細胞を4日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図18は、5  $\mu$ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、BeWo細胞を4日間培養し、calcein蛍光発色で生存細胞を観察した蛍光顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図19は、5  $\mu$ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、BeWo細胞を4日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図20は、5  $\mu$ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、BeWo細胞を4日間培養し、calcein蛍光発色で生存細胞を観察した蛍光顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図21は、切片の付着していないスライドグラス上で、BeWo細胞を1日間

培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、 $200\mu\text{m}$ に相当)

図22は、 $5\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、 $200\mu\text{m}$ に相当)

図23は、 $10\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、 $200\mu\text{m}$ に相当)

図24は、 $20\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、 $200\mu\text{m}$ に相当)

図25は、 $5\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、 $200\mu\text{m}$ に相当)

図26は、 $10\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、 $200\mu\text{m}$ に相当)

図27は、 $20\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、BeWo細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、 $200\mu\text{m}$ に相当)

図28は、 $20\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、NHDF細胞を培養した。切片上で多層化増殖した細胞は、培養7日目に、切片由来組織を取り込んでシート上にスライドガラスから剥離し始めた。その位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、 $200\mu\text{m}$ に相当)

図29は、 $20\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1%SDS処理で無

細胞化した細胞培養担体上で、NHDF細胞を培養した。切片上で多層化増殖した細胞は、培養7日目に、切片由来組織を取り込んでシート上にスライドガラスから剥離し始めた。図28と異なる部分の位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図30は、20  $\mu$ mの切片上で多層化増殖したNHDF細胞が、完全に培養液中に剥離したときの位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図31は、切片由来組織を取り込んだ細胞シートを、疎水性培養皿内で培養して7時間後の位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図32は、疎水性培養皿内で培養して2日後に形成された、切片由来組織を取り込んだ三次元の多細胞性凝縮塊の位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図33は、切片の付着していないスライドガラス上で、CPAE細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図34は、5  $\mu$ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、CPAE細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図35は、5  $\mu$ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、CPAE細胞を1日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図36は、切片の付着していないスライドガラス上で、CPAE細胞を3日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図37は、5  $\mu$ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、CPAE細胞を3日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図38は、5  $\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、CPAE細胞を3日間培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu\text{m}$ に相当)

図39は、5  $\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、CPAE細胞を3日間培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu\text{m}$ に相当)

図40は、5  $\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、CPAE細胞を3日間培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu\text{m}$ に相当)

図41は、5  $\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、PC-12細胞を2日間培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真である。特に、ウシ胎盤切片上で、胎盤中隔がある絨毛叢に相当する領域。(写真上のバーは、200  $\mu\text{m}$ に相当)

図42は、10  $\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、PC-12細胞を2日間培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真である。特に、ウシ胎盤切片上で、胎盤中隔がある絨毛叢に相当する領域。(写真上のバーは、200  $\mu\text{m}$ に相当)

図43は、20  $\mu\text{m}$ に薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、PC-12細胞を2日間培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真である。特に、ウシ胎盤切片上で、胎盤中隔がある絨毛叢に相当する領域。(写真上のバーは、200  $\mu\text{m}$ に相当)

図44は、切片の付着していないスライドガラス上で、PC-12細胞を2日間培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu\text{m}$ に相当)

図45は、10  $\mu$ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、PC-12細胞を2日間培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真である。特に、ウシ胎盤切片上で、絨毛叢に接する子宮小丘の結合組織が豊富な領域。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図46は、10  $\mu$ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、PC-12細胞を2日間培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真である。特に、ウシ胎盤切片上で、子宮小丘の粘膜固有層側の領域。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図47は、切片の付着していないスライドガラス上で、PC-12細胞を5日間無血清培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図48は、5  $\mu$ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、PC-12細胞を5日間無血清培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図49は、5  $\mu$ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、PC-12細胞を5日間無血清培養した位相差顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図50は、5  $\mu$ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体上で、PC-12細胞を5日間無血清培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

図51は、5  $\mu$ mに薄切したウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体上で、PC-12細胞を5日間無血清培養した後に、ヘマトキシリン・エオシン染色した光学顕微鏡写真である。(写真上のバーは、200  $\mu$ mに相当)

## 発明を実施するための最良の形態

この出願の発明は、上記のとおりの特徴を有するものであるが、以下にその実施の形態について説明する。

この出願の発明で用いられる生物の組織は、動物の生前または生後の全身または一部の組織であっても、植物の全体または一部の組織であっても、さらには、それらの組織が予め固定液で固定した組織であっても新鮮な組織であってもよい。固定液としては、メタノール、エタノール、アセトン、ホルマリン、グルタルアルデヒド等が挙げられる。哺乳動物としては、ヒト、サル、ウシ、羊、ヤギ、ヒヒ、ブタ、イヌ、ウサギ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス等が挙げられる。動物の組織は、全身または一部組織であれば特に限定されないが、例えば、脳、脊髄、筋肉、皮膚、血管、食道、胃、小腸、大腸、心臓、肺臓、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胸腺、骨、軟骨、骨髓、子宮、卵巣、卵管、精巣、胎盤、臍帯等が挙げられ、さらにそれらの正常組織であっても、腫瘍をはじめ各種病巣組織であってもよい。

この発明で用いられる生物の組織を薄切した切片は、凍結切片であっても、パラフィン切片であっても、または樹脂切片であってもよい。組織学や病理学の分野では、動物や植物の全体または一部組織の薄切切片を作製して、スライドグラス上に薄切切片を伸展し、種々の染色を施した後に顕微鏡で観察するといった一連の実験手法は、極めて日常的である。生体組織の薄切切片には、言うまでもなく生体組織の場所的かつ時間的情報が全て含まれており、各々の情報は一般染色のみならず免疫組織化学的手法やin situハイブリダイゼーション技術により解析が可能である。

このような技術を利用して、薄切切片に生理活性物質を結合できる抗体や核酸プローブの処理を施して、切片上の特定の場所に外来性の生理活性物質を導入することも可能である。生理活性物質としては、タンパク質、糖タンパク質、リポ



タンパク質、ペプチド、糖質、脂質、糖脂質、核酸、低分子化合物、等が挙げられる。これら生理活性物質の作用としては、抗体活性、酵素活性、ホルモン、サイトカイン、細胞接着、増殖、分化、再生、形態形成、等が挙げられる。

さらに、薄切切片に酵素の処理など生物学的処理を施したり、もしくは酸やアルカリや界面活性剤の処理など化学的処理を施したりして、薄切切片に於ける生物の構成成分や微細構造を改変したり修飾したりすることも可能である。この出願の発明においても、凍結切片は、未固定もしくはホルマリン等で固定した生物の組織を直接、もしくはOCTコンパウンドに包埋した後に液体窒素等で急速冷凍した後、凍結ミクロトームで1～50  $\mu\text{m}$ 、好ましくは4～20  $\mu\text{m}$ の厚さに薄切して調製すること等ができる。未固定の凍結切片は、薄切後にホルマリン等で固定することもできる。パラフィン切片は、通常、生物の組織をホルマリン等で固定した後、エタノールで脱水し、キシレン、パラフィンと置換して、パラフィンに包埋した後に、ミクロトームで0.5～50  $\mu\text{m}$ 、好ましくは2～20  $\mu\text{m}$ の厚さに薄切して調製する。また、樹脂切片は、通常、生物の組織をホルマリン等で固定した後、エタノールで脱水し、ヒストレジン等の樹脂に包埋した後に、ミクロトームで0.1～50  $\mu\text{m}$ 、好ましくは0.5～10  $\mu\text{m}$ の厚さに薄切して調製する。

また、この発明で用いられる無細胞化の処理は、薄切する前の生物の組織に施されても、もしくは生物の組織を薄切した切片に施されてもよい。無細胞化の処理には、塩類、アルカリ、界面活性剤、キレート剤、または酵素等を含む溶液が単独もしくは組み合わせて用いられる。塩類としては、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、リン酸カリウム等が挙げられ、アルカリとしては、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム、アンモニア等が挙げられる。また、界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム、Triton X-100、Tween 20および80等が挙げられ、キレート剤としては、EDTA、EGTA等が挙げられる。さ

らに、酵素としては、トリプシン、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、エラスターゼ、パパイン、マトリックスメタロプロテアーゼ等の蛋白分解酵素、ヒアルロニダーゼ等の糖分解酵素、デオキシリボヌクレアーゼ等の核酸分解酵素等が挙げられる。

この発明で用いられる生物組織の薄切切片からなる培養担体は、薄切切片のみから構成されていても、薄切切片がガラス、プラスチック、ゴム、金属、天然または合成の糸および／またはその織成体、および生体吸収性材料等の支持体に付着または付着伸展した複合体から構成されていてもよい。また、支持体に予め切片の付着または付着伸展を促進する処理が施されていてもよい。切片の付着または付着伸展を促進する処理としては、支持体へのポリリジン、APS等のコートが挙げられる。また、培養担体とする薄切切片にOCTコンパウンド、パラフィン、樹脂等が混入している場合は、水洗、脱パラフィン処理、もしくは脱樹脂処理を施すこともできる。さらに、培養担体とする薄切切片には、エタノール処理、エチレンオキサイドガス処理、および $\gamma$ 線や紫外線処理等の滅菌処理を施すこともできる。

そして、この発明で用いられる動物細胞は、初代培養細胞であっても、株化細胞であっても、受精卵であっても、またはそれらに外来性遺伝子を導入した細胞であってもよく、さらに細胞は1種類であっても2種類以上であってもよい。

さらに、動物細胞は、未分化な幹細胞、分化過程にある細胞、終末分化した細胞、および／または脱分化した細胞のいずれに由来してもよい。未分化な幹細胞が、特に胚性幹細胞であってもよい。このような動物細胞の培養は、細胞懸濁液、細切組織片、受精卵、または三次元再構築した多細胞性凝集塊を播種することで開始できる。動物細胞の培養に用いる培養液は、通常の動物細胞培養用の培養液であればよく、如何なる組成の基礎培養液であっても、また血清、抗生物質、ビタミン、等が添加されていても添加されていなくてもよい。また、培養した動

物細胞と切片の親和力が切片と支持体の親和力より勝るように、適当な支持体を選択することで、動物細胞が付着増殖した切片または切片に由来する組織を支持体から剥離することが可能となる。さらに、支持体から剥離した後に培養を続けることで、切片または切片に由来する組織を取り込んだ三次元の多細胞性凝集塊を形成することも可能となる。

また、この発明の培養担体を用いる動物細胞の培養は、例えば、動物の組織を厚さ  $6\ \mu\text{m}$  に薄切した凍結切片の 1 または 2 以上の 1 枚または 2 枚以上を付着伸展したスライドガラスに、固定、無細胞化、滅菌、培養液を用いた平衡化等の必要な処理を施した後に、そのスライドガラスを培養シャーレに装入して、動物細胞の懸濁液を播種することで、容易に達成できる。さらに、この発明の培養担体を用いる動物細胞の移植は、例えば、動物の組織を厚さ  $6\ \mu\text{m}$  に薄切した凍結切片を付着した生体吸収性メッシュに、固定、無細胞化、滅菌、培養液を用いた平衡化等の必要な処理を施した後に、その生体吸収性メッシュを培養シャーレに装入して、動物細胞の懸濁液を播種して培養した後の培養担体を移植することで、容易に達成できる。

#### 実施例

##### (実施例 1 : 動物組織を薄切した切片からなる細胞培養担体の作製)

屠殺により採取した妊娠 241 日齢のウシ胎盤を OCT コンパウンドに包埋した後に、液体窒素で急速凍結した。凍結ミクロトームで、5, 10,  $20\ \mu\text{m}$  に薄切した切片を、スライドガラス（松浪硝子工業（株）製 S-0317）上に調製した。これ以降の操作は、クリーンベンチ内で行った。この凍結切片を付着伸展したスライドガラス 4 枚を、菌液トレイ（住友ベークライト（株）製 MS-3300N）に装入した（図 1 参照）。この菌液トレイに 20 ml の HBS S (Hanks' Balanced Salt Solution; GIBCO BRL #14025-092) を注入して、室温で 5 分間静置した後に除去した。この操作で、切片より OCT コンパウンドを除去した。次に、菌液トレ

イに20mlの70%エタノールを注入して、室温で10分間静置した後に除去した。この操作で、切片組織の固定および滅菌を行った。その後、菌液トレイ内の切片付着スライドガラスを20mlのHBSSで2回、20mlの培養液で1回、リンスした。このようにして、ウシ胎盤の凍結切片からなる細胞培養担体を、スライドガラスを支持体として、以後培養容器として使用する菌液トレイ内に作製した。この細胞培養担体を、定法に従いヘマトキシリン・エオシン染色で観察した。その結果、この細胞培養担体はウシ胎盤の組織であることが確認できた(図2参照)。

一方、屠殺により採取した発情後13日目の未経産ウシの子宮を、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した後、病理組織学の定法に従いパラフィンに包埋した。ミクロトームで5 $\mu$ mに薄切した切片を、スライドガラス(松浪硝子工業(株)製S-0317)上に付着伸展した。このスライドガラスを、キシレンで脱パラフィン処理した後、100%から50%までのエタノールで順次処理した。これ以降の操作は、クリーンベンチ内で行った。切片を付着伸展したスライドガラス1枚を、直径100mmの培養皿(Falcon #351001)に挿入した。この培養皿に、10mlのHBSSを注入して、室温で5分間穏やかに攪拌することで、切片をスライドガラスより剥離した。剥離した切片を、ピペットで少量でのHBSSと共に、予め2mlの滅菌水を注いである直径35mmのポリスチレン製の親水性培養皿(Falcon #353001)あるいは疎水性培養皿(Falcon #351008)に、1枚の培養皿に1切片ずつ移し入れた。各々の培養皿内で、切片を2mlの滅菌水で2回リンスした。親水性培養皿については、切片を伸展した状態で、できるだけ滅菌水を除去してから風乾した。このようにして、ウシ子宮のパラフィン切片由来の細胞培養担体を、直径35mmのポリスチレン製の親水性培養皿を支持体として作製した(図3参照)。疎水性培養皿については、滅菌水で2回リンスした後、2mlの70%エタノールで1回リンスした。そして、切片を伸展した状態で、できる

だけ70%エタノールを除去してから風乾した。このようにして、ウシ子宮のパラフィン切片由来の細胞培養担体を、直径35mmのポリスチレン製の疎水性培養皿を支持体として作製した(図4参照)。

(実施例2: 無細胞化処理した切片からなる細胞培養担体の作製)

実施例1と同様に、クリーンベンチ内の菌液トレイへウシ胎盤の凍結切片を付着伸展したスライドガラスを装入して、20mlのHBSSを注入し室温で5分間静置して、切片よりOCTコンパウンドを除去した。次に、菌液トレイ内の切片付着スライドガラスを1枚ずつ、直径100mmの培養皿(Falcon #351001)に移し入れた。各々10mlの0.01, 0.1, 0.5、および1.0% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)を注入して、室温で10分間静置した後に除去した。この操作で、切片組織を無細胞化することを検討した。その後、培養皿内の切片付着スライドガラスを20mlのHBSSで2回、10mlの培養液で1回、リンスした。各々の切片を、定法に従いヘマトキシリン・エオシン染色で観察した。その結果、0.1% SDSで処理することで、ウシ胎盤の凍結切片は無細胞化できることが確認できた(図5-8参照)。このようにして、ウシ胎盤の凍結切片を無細胞化した細胞培養担体を、スライドガラスを支持体として作製した。

(実施例3: ウシ胎盤凍結切片からなる細胞培養担体上でのBeWo細胞の培養)

ヒトの絨毛癌細胞株であるBeWo細胞を用いて、切片からなる細胞培養担体の毒性、および細胞の接着伸展や増殖性に対する影響、さらに切片の厚さの違いによる細胞形態への影響を検討した。BeWo細胞(ヒューマンサイエンス振興財団より分譲JCRB9111)は、培養液(15%非動化牛胎仔血清(SIGMA #F-2442)、100units/mlペニシリン、および100μg/mlストレプトマイシン(GIBCO BRL#15140-148)を含有するHam's F12(GIBCO BRL #11765-054)で継代培養した。

実施例1でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の5  $\mu\text{m}$ の凍結切片からなる細胞培養担体、および実施例2でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の5  $\mu\text{m}$ の凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体を、菌液トレイ内に各々スライドグラス2枚ずつ計4枚を挿入した。この菌液トレイに、20 mlの培養液に懸濁したBeWo細胞を、終濃度が $2.1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ となるように播種して、5%  $\text{CO}_2$ 、95%空気、37℃の保湿インキュベータ内で培養した。培養1日目に、菌液トレイ内のスライドグラスを、10 mlの培養液を入れた直径100 mmの培養皿内へ1枚ずつ移し入れた。以後、毎日培養液の交換を行い、4日目まで培養した。培養1日目と4日目に、培養細胞の位相差顕微鏡による形態観察、および生存細胞のcalcein AM (Molecular Probes #L-3224) 代謝能を利用したcalcein蛍光発色の蛍光顕微鏡による観察を行った。培養細胞のcalcein AM代謝能は、培養皿内の培養液を除去し、10 mlのPBSで細胞を2回リンスした後、10 mlの2  $\mu\text{M}$  calcein AMを含むHBSSで15分間、5%  $\text{CO}_2$ 、95%空気、37℃の保湿インキュベータ内で培養した後、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、切片上、および無細胞化処理した切片上でも、切片の付着していないスライドグラス上と同様に、細胞は培養1日目で接着伸展し、培養4日目には増殖していること、さらに、接着伸展し増殖した細胞は、いずれの担体上でも生存していることが分かった(図9-20参照)。この結果は、切片、および無細胞化処理した切片からなる細胞培養担体には、細胞毒性が無いことを示唆する。

次に、実施例1でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の5, 10, 20  $\mu\text{m}$ 凍結切片からなる細胞培養担体、および実施例2でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の5, 10, 20  $\mu\text{m}$ 凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体を、菌液トレイ内に挿入した。この菌液トレイに、20 mlの培養液に懸濁したBeWo細胞を、終濃度が $4.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ となるように播種し

て、5%CO<sub>2</sub>、95%空気、37℃の保湿インキュベータ内で1日間培養した。位相差顕微鏡による培養細胞の形態観察を行った結果、切片の付着していないスライドグラス上では、接着したコロニー内で個々の細胞は敷石状によく伸展していたが、切片上および無細胞化処理した切片上では切片の厚みが増すにつれて、接着したコロニー内で個々の細胞は丸く凝集する傾向を示すことが分かった（図21-27参照）。

（実施例4：ウシ胎盤凍結切片からなる細胞培養担体上でのNHDF細胞の培養）

正常ヒト新生児包皮皮膚線維芽細胞であるNHDF細胞を用いて、切片からなる細胞培養担体を取り込んだ多細胞性三次元凝集塊の形成を検討した。NHDF細胞（倉敷紡績（株）KF-4109）は、培養液（10%非動化牛胎仔血清、20mM HEPES (GIBCO BRL #15630-080)、100units/ml ペニシリン、および100μg/ml ストレプトマイシンを含有するDMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; GIBCO BRL #11885-084)）で継代培養した。

実施例1でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の5, 10, 20μm凍結切片からなる細胞培養担体、および実施例2でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の5, 10, 20μm凍結切片を0.1%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体を、菌液トレイ内に挿入した。この菌液トレイに、20mlの培養液に懸濁したNHDF細胞を、終濃度が $3.3 \times 10^4 / \text{cm}^2$ となるように播種して、5%CO<sub>2</sub>、95%空気、37℃の保湿インキュベータ内で培養した。培養4時間後に、菌液トレイ内のスライドグラスを、10mlの培養液を入れた直径100mmの培養皿内へ1枚ずつ移し入れた。以後、1日おきに培養液の交換を行い、9日目まで培養した。位相差顕微鏡による培養細胞の形態観察を行った結果、培養7日目に、無細胞化処理した20μm切片上で多層化増殖した細胞は、切片由来組織を取り込んでシート状にスライドグラスから剥離し始め（図28、29参

照)、軽くピペッティングすることで完全に剥離し培養液中に浮遊した(図30参照)。この剥離した細胞シートを、細胞が接着し辛いとされている直径35mmのポリスチレン製の疎水性培養皿へ、2mlの培養液と共に移し入れて培養を続けた。切片由来組織を取り込んだ細胞シートは、疎水性培養皿内で培養して7時間目にはかなり凝集し(図31参照)、2日目(培養開始後9日目)には周囲が滑らかな三次元の多細胞性凝集塊を形成した(図32参照)。なお、培養開始後8日目には、無細胞化処理した10 $\mu$ m切片上で多層化増殖した細胞もスライドガラスから剥離し始めることが、さらに、培養開始後9日目には、残りの5, 10, 20 $\mu$ m切片上および無細胞化処理した5 $\mu$ m切片上で多層化増殖した細胞も、スライドガラスから剥離し始めることが分かった。

(実施例5:ウシ胎盤凍結切片からなる細胞培養担体上でのCPAE細胞の培養)

ウシの肺動脈血管内皮細胞株であるCPAE細胞を用いて、切片からなる細胞培養担体による形態形成を検討した。CPAE細胞(ヒューマンサイエンス振興財団より分譲JCRB9022)は、培養液(10%非動化牛胎仔血清、20mM HEPES、100units/mlペニシリン、および100 $\mu$ g/mlストレプトマイシンを含有するDMEM)で継代培養した。

実施例1でスライドガラス上に作製したウシ胎盤の5 $\mu$ m凍結切片からなる細胞培養担体、および実施例2でスライドガラス上に作製したウシ胎盤の5 $\mu$ m凍結切片を0.1%SDS処理で無細胞化した細胞培養担体を、菌液トレイ内に挿入した。この菌液トレイに、20mlの培養液に懸濁したCPAE細胞を、終濃度が $3.4 \times 10^4 / \text{cm}^2$ となるように播種して、5%CO<sub>2</sub>、95%空気、37℃の保湿インキュベータ内で培養した。培養1日後に、菌液トレイ内のスライドガラスを、10mlの培養液を入れた直径100mmの培養皿内へ1枚ずつ移し入れた。以後、1日おきに培養液の交換を行い、3日目まで培養した。その結果



、培養1日目の位相差顕微鏡による培養細胞の形態観察では、切片の付着していないスライドグラス上で培養した細胞は敷石状形態を示す細胞が多いのに対して、切片上および無細胞化処理した切片上で培養した細胞は比較的細長く伸展した形態を示す細胞が多いことが分かった（図33-35参照）。さらに、培養3日目の位相差顕微鏡による培養細胞の形態観察、およびヘマトキシリン・エオシン染色したスライドグラスの光学顕微鏡による観察では、切片の付着していないスライドグラス上で培養した胎どの細胞は敷石状形態を示すのに対して、切片上および無細胞化処理した切片上で培養した細胞は、切片由来組織を取り込んで血管網様構造を形成することが分かった（図36-40参照）。

（実施例6—ウシ胎盤凍結切片からなる細胞培養担体上でのPC-12細胞の培養）

ラット褐色細胞腫であるPC-12細胞を用いて、切片からなる細胞培養担体による形態形成を、通常の継代培養に用いる培養液による培養と無血清培養液による培養の両方で検討した。PC-12細胞（理化学研究所ジーンバンク細胞開発銀行より分譲RCB0009）は、培養液（10%非動化牛胎仔血清、20mM HEPES、100units/mlペニシリン、および100μg/mlストレプトマイシンを含有するDMEM）で継代培養した。

実施例1でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の5, 10, 20μm凍結切片からなる細胞培養担体を、菌液トレイ内に挿入した。この菌液トレイに、20mlの培養液に懸濁したPC-12細胞を、終濃度が $1.45 \times 10^4 / \text{cm}^2$ となるように播種して、5%CO<sub>2</sub>、95%空気、37℃の保温インキュベータ内で培養した。培養4時間後に、菌液トレイ内のスライドグラスを、10mlの培養液を入れた直径100mmの培養皿内へ1枚ずつ移し入れた。以後、毎日培養液の交換を行い、2日目まで培養した。2日間培養した後に、スライドグラスをヘマトキシリン・エオシン染色して光学顕微鏡による観察を行った結果、5, 1

0, 20  $\mu\text{m}$ のいずれの厚みの切片においてもウシ胎盤由来の細胞が観察できないこと（図41-43参照）、および切片上で培養した細胞は、切片の付着していないスライドグラス上で培養した細胞に比べて大きく接着伸展していること（図44参照）が分かった。さらに、ウシ胎盤切片上で、胎盤中隔がある絨毛叢に相当する領域では、胎盤中隔上で敷石状細胞が主に接着伸展して、胎盤中隔の縁に沿って扁平化細胞が接着伸展していること（図42参照）、ウシ胎盤切片上で、絨毛叢に接する子宮小丘の結合織が豊富な領域では、敷石状細胞が接着伸展していること（図45参照）、および、ウシ胎盤切片上で、子宮小丘の粘膜固有層側の領域では、子宮腺や血管の内腔側に沿って扁平化細胞が接着伸展していること（図46参照）が分かった。この結果は、培養細胞が、切片上の微細構造を認識して細胞形態を変化させていることを示唆する。

次に、実施例1でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の5  $\mu\text{m}$ 凍結切片からなる細胞培養担体、および実施例2でスライドグラス上に作製したウシ胎盤の5  $\mu\text{m}$ 凍結切片を0.1% SDS処理で無細胞化した細胞培養担体を菌液トレイ内に挿入した。この菌液トレイに、20 mlの無血清培養液に懸濁したPC-12細胞を、終濃度が $4.6 \times 10^4 / \text{cm}^2$ となるように播種して5%  $\text{CO}_2$ 、95% 空気、37°Cの保温インキュベータ内で培養した。培養4時間後に、菌液トレイ内のスライドグラスを、10 mlの無血清培養液を入れた直径100 mmの培養皿内へ1枚ずつ移し入れた。以後、1日おきに無血清培養液の交換を行い、5日目まで培養した。その結果、培養5日目の位相差顕微鏡による培養細胞の形態観察では、切片の付着していないスライドグラス上で培養した細胞は、殆んど全てが死んでいる（図47参照）のに対して、無細胞化処理した切片上で培養した細胞は、敷石状に接着伸展して生きている細胞もいること（図48参照）、さらに、切片上で培養した細胞は、殆んど全てが敷石状に接着伸展して生きていること（図49参照）が分かった。さらに、培養5日目のスライドグラスをヘマトキシ

リン・エオシン染色した後の光学顕微鏡による観察では、切片上および無細胞化処理した切片上で培養した細胞は、敷石状に接着伸展して生きていること、さらに、切片上で培養した場合にもウシ胎盤由来の細胞が明瞭に観察できること、および無細胞化処理した切片上で培養した場合は、ウシ胎盤由来の細胞が除去された無細胞組織が明瞭に観察できることが分かった（図50、51参照）。この結果は、切片からなる細胞培養担体は、無血清培養した際に、細胞の長期間生存維持を可能にすること、および、細胞を無血清培養することで、長期間培養後でも切片由来の細胞や組織を維持できることを示唆する。

もちろん、この発明は、以上の例によって何ら限定されるものではない。スライドグラスの上には、複数個(枚)の切片が載置されていてもよいことは言うまでもない。そして切片を作製する動物組織はもとより、培養対象となる動物細胞、切片の状態、支持体、培養液組成、培養条件などについても様々な態様が可能であることは多言を要しない。この出願の発明は、これら各種の形態、態様を包括するものである。

#### 産業上の利用可能性

この出願の発明により、動物細胞の培養担体として、より生体組織に近い培養環境、即ち、目的とする生体組織の場所的かつ時間的情報が組込まれた環境が提供される。この出願の発明の培養担体上で細胞を培養することにより、目的とする細胞と、生体組織の場所的かつ時間的情報との相互作用を利用した細胞の諸性質や特性の解明、およびその相互作用を利用した遺伝子の機能解析、さらには生体組織の鋳型を利用した組織の再構築、およびその再構築組織の移植が可能となる。

## 請求の範囲

1. 動物細胞を培養する担体が、生物の組織を薄切した切片からなることを特徴とする細胞培養担体。
2. 生物の組織を薄切した切片が、支持体に付着または付着伸展している請求項 1 記載の細胞培養担体。
3. 支持体が、ガラス、プラスチック、ゴム、金属、天然または合成の糸および／またはその織成体、および生体吸収性材料から選ばれる 1 種以上である請求項 2 記載の細胞培養担体。
4. 支持体には予め切片の付着または付着伸展を促進する処理が施されている請求項 2 または 3 記載の細胞培養担体。
5. 生物の組織が、新鮮な組織または予め固定液で固定した組織である請求項 1 記載の細胞培養担体。
6. 薄切する前の生物の組織、または生物の組織を薄切した切片に無細胞化する処理が施されている請求項 1 記載の細胞培養担体。
7. 生物の組織を薄切した切片に、生理活性物質を結合できる抗体や核酸プローブの処理を施して、切片上の特定の場所に外来性の生理活性物質を導入することを特徴とする請求項 1 記載の細胞培養担体。
8. 生物の組織を薄切した切片に、酵素の処理など生物学的処理または酸やアルカリや界面活性剤の処理など化学的処理を施して、切片に於ける生物の構成成分や微細構造を改変もしくは修飾することを特徴とする請求項 1 記載の細胞培養担体。
9. 生物の組織を薄切するために、予め生物の組織が凍結または凍結包埋、パラフィン包埋、または樹脂包埋されている請求項 1 記載の細胞培養担体。
10. 生物が動物または植物である請求項 1 記載の細胞培養担体。

- 1 1. 動物が哺乳動物である請求項 1 0 記載の細胞培養担体。
- 1 2. 生物の組織が、生前の発生段階にある動物の全身または一部である請求項 1 記載の細胞培養担体。
- 1 3. 生物の組織が、生後の動物の全身または一部である請求項 1 記載の細胞培養担体。
- 1 4. 請求項 1 ないし 1 3 記載のいずれかの細胞培養担体を培養容器に装入して動物細胞を培養することを特徴とする細胞培養方法。
- 1 5. 動物細胞の培養を開始する手段が、細胞懸濁液、細切組織片、受精卵、または三次元再構築した多細胞性凝集塊の播種によることを特徴とする請求項 1 4 記載の細胞培養方法。
- 1 6. 播種した動物細胞が付着増殖して、切片または切片に由来する組織を、請求項 2 ないし 4 記載のいずれかの支持体から剥離することを特徴とする請求項 1 4 ないし 1 5 記載の細胞培養方法。
- 1 7. 支持体から剥離した後に培養を続けることで、切片または切片に由来する組織を取り込んだ三次元の多細胞性凝集塊を形成することを特徴とする請求項 1 6 記載の細胞培養方法。
- 1 8. 培養する動物細胞が、初代培養細胞、株化細胞、受精卵、および／またはそれらに外来性遺伝子を導入した細胞から選ばれる 1 種または 2 種以上である請求項 1 4 記載の細胞培養方法。
- 1 9. 培養する動物細胞が、未分化な幹細胞、分化過程にある細胞、終末分化した細胞、および／または脱分化した細胞に由来することを特徴とする請求項 1 4 記載の細胞培養方法。
- 2 0. 未分化な幹細胞が、特に胚性幹細胞であることを特徴とする請求項 1 9 記載の細胞培養方法。
- 2 1. 動物細胞を培養する培養液が、血清含有の培養液または血清非含有の無

血清培養液であることを特徴とする請求項 14 ないし 20 記載のいずれかの細胞培養方法。

22. 請求項 14 ないし 21 記載のいずれかの細胞培養方法により培養した動物細胞を、動物に移植することを特徴とする細胞移植方法。

23. 移植する動物が哺乳動物である請求項 22 記載の細胞移植方法。

1

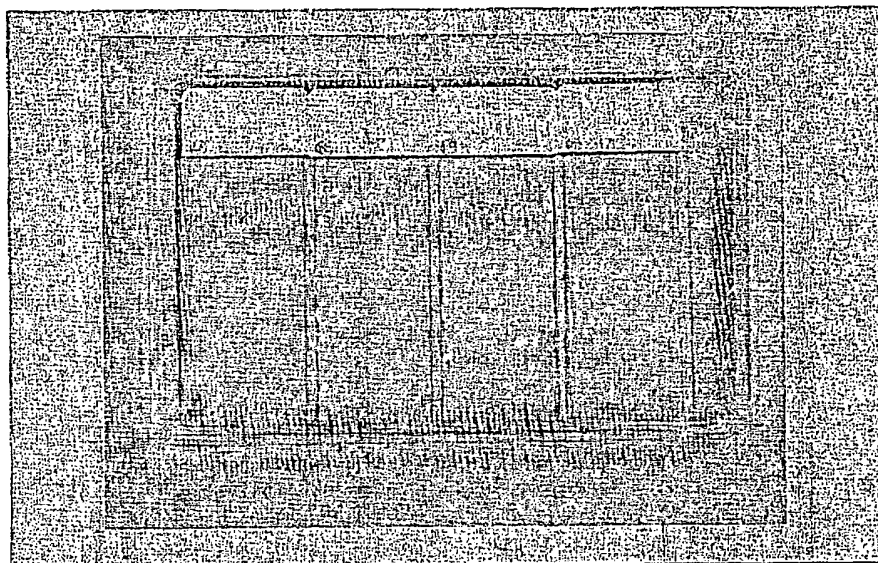
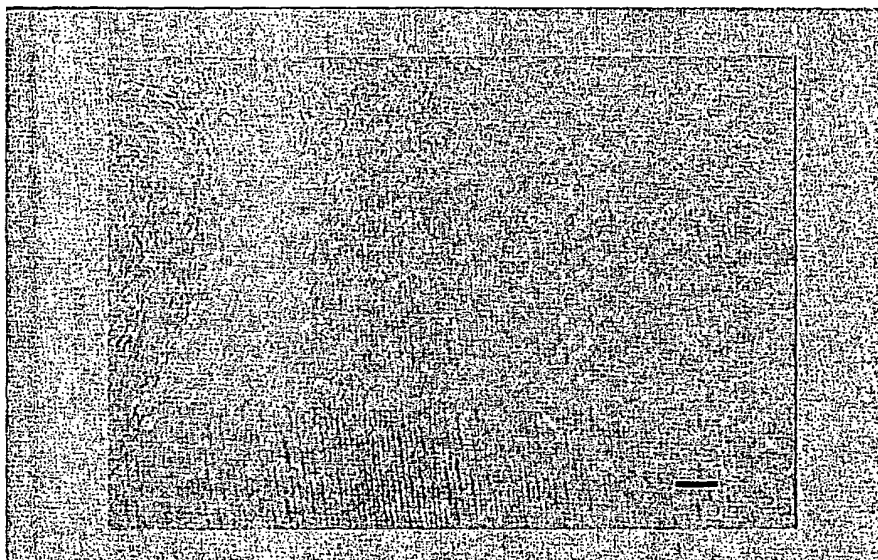




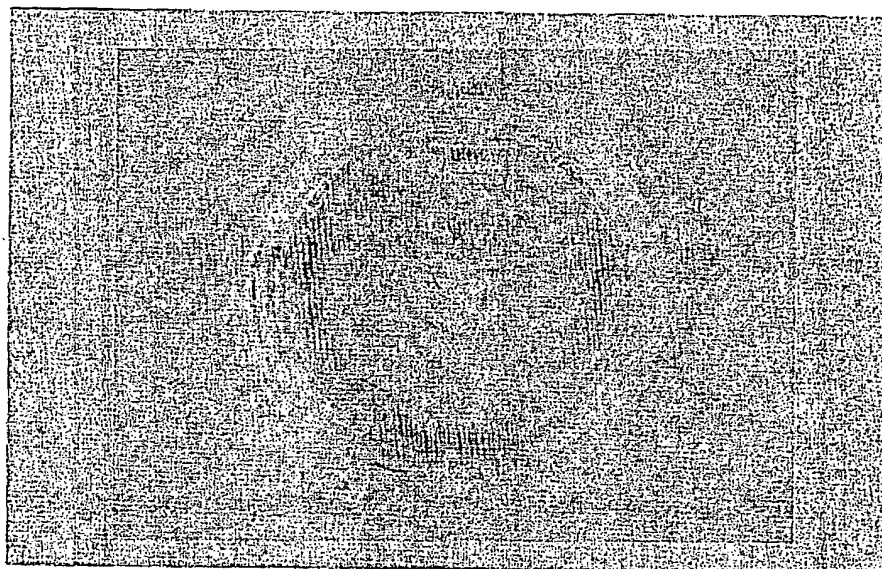


図 2





3





⊠ 4

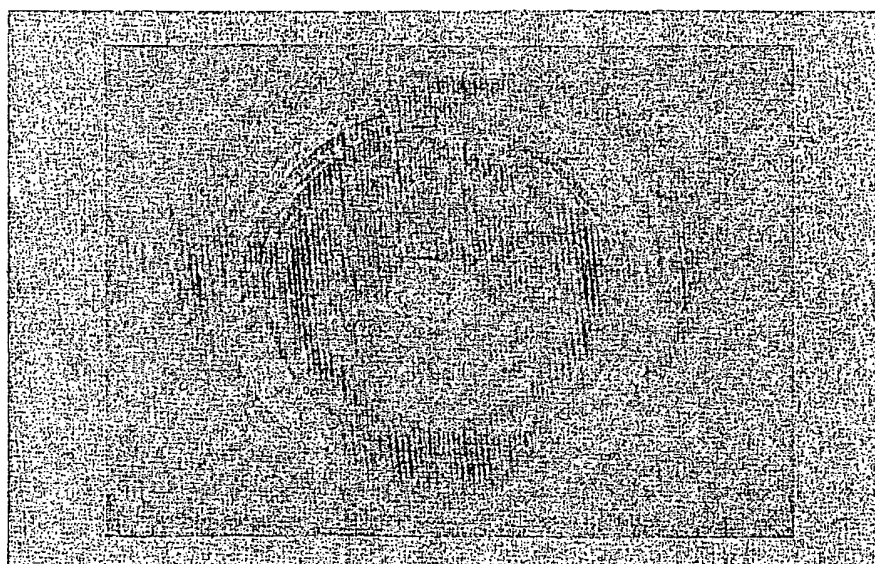




図 5

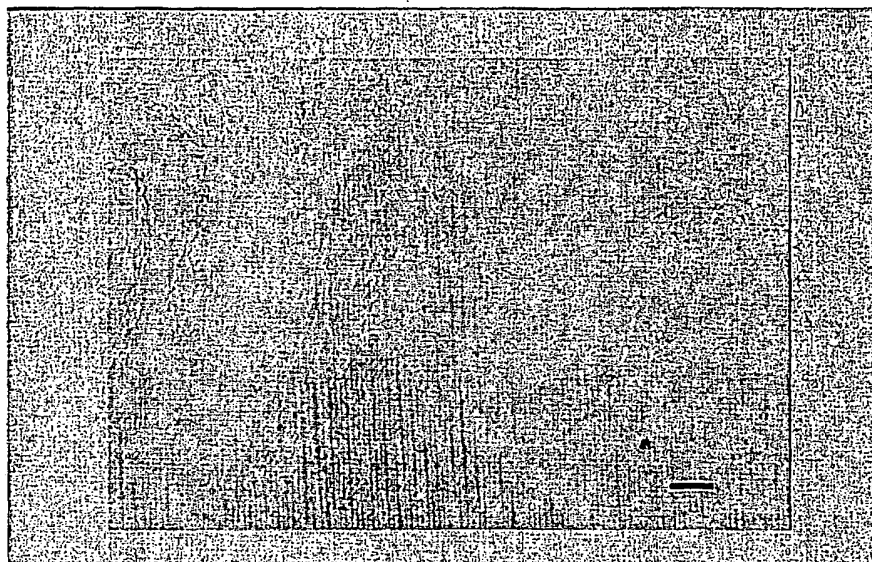






図 6

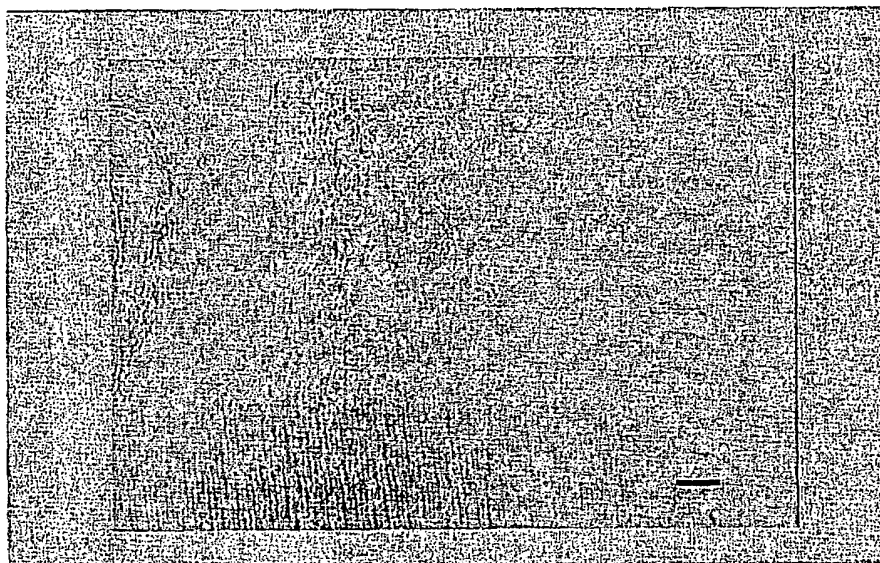
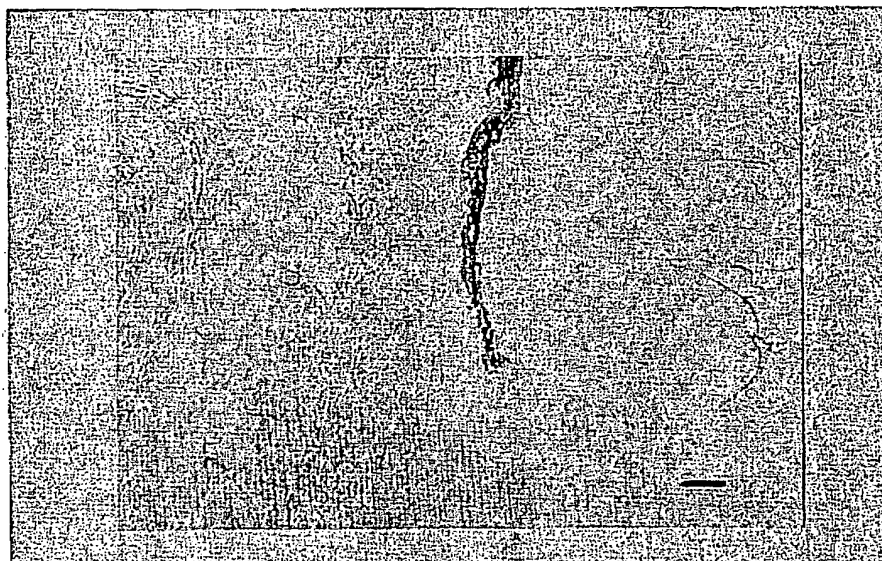




図 7





☒ 8

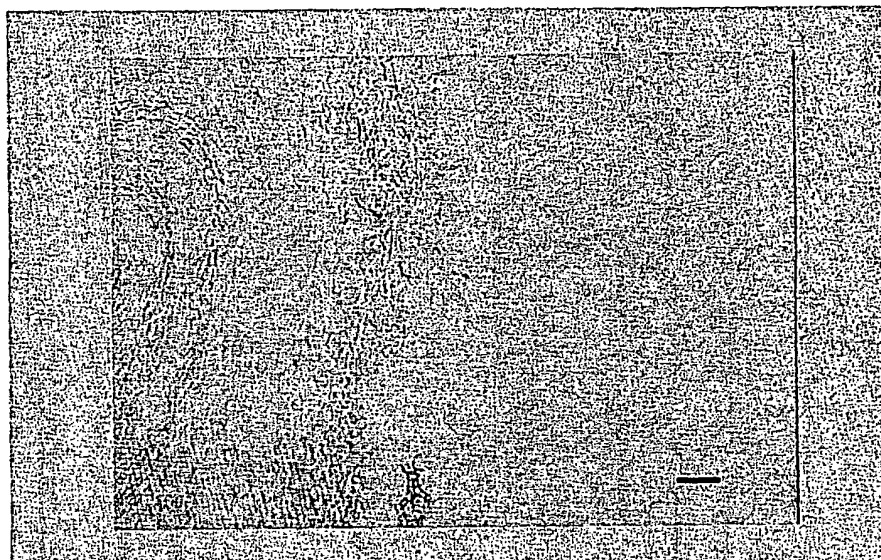
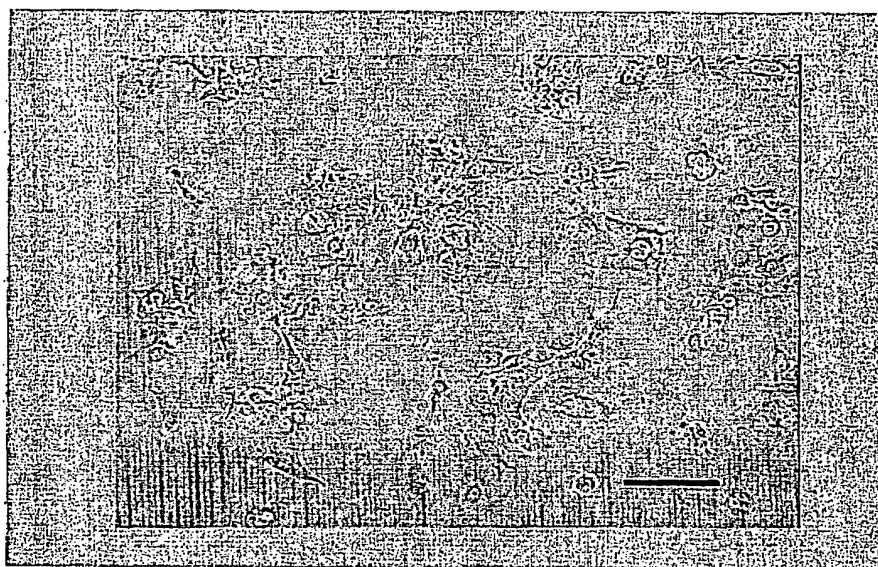




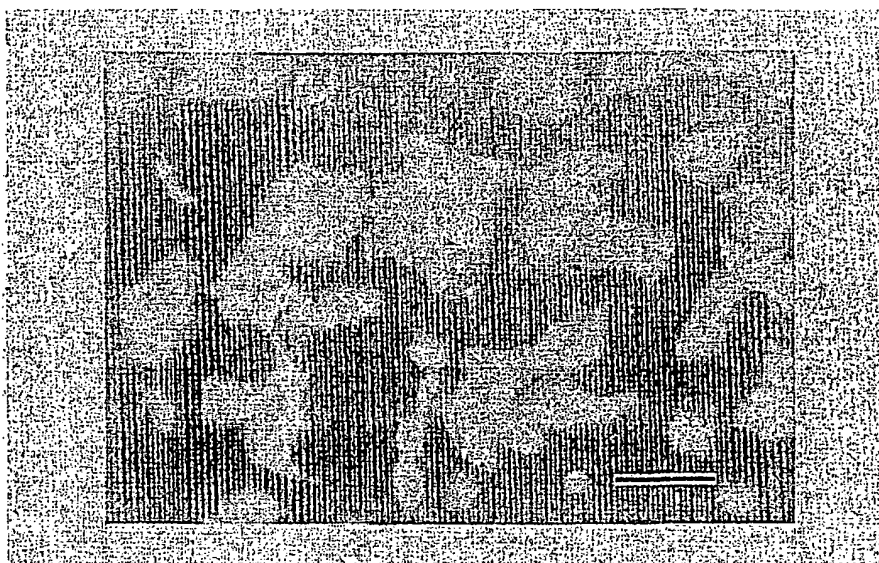
図 9





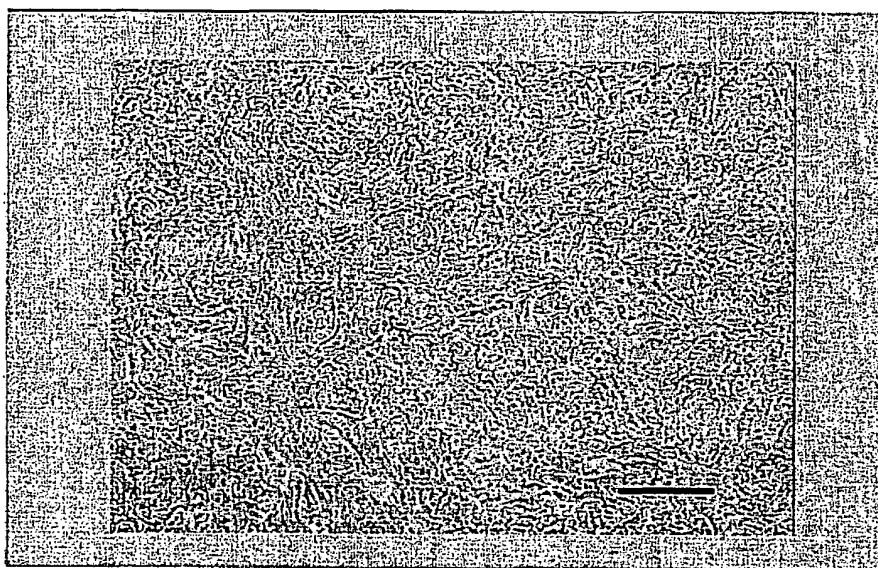


⊠ 10





11





⊠ 12





☒ 13

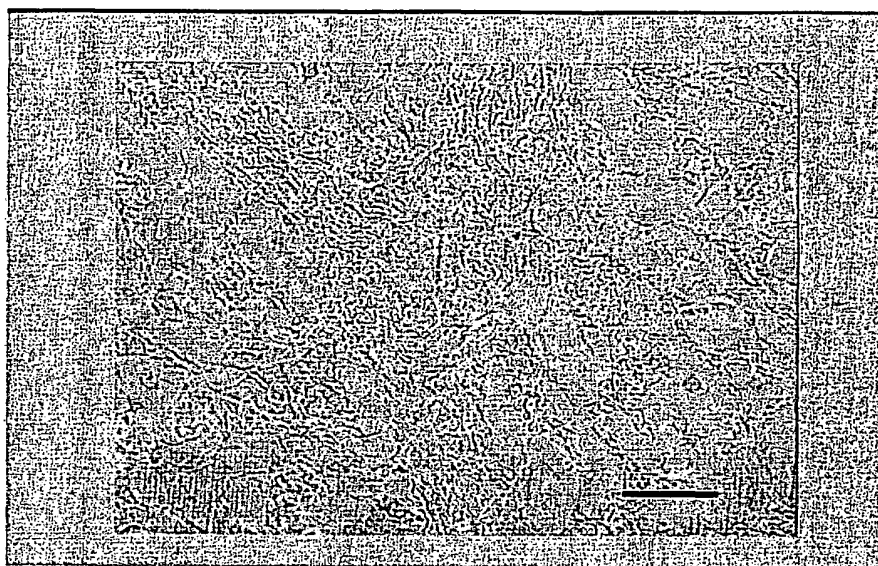






図 14

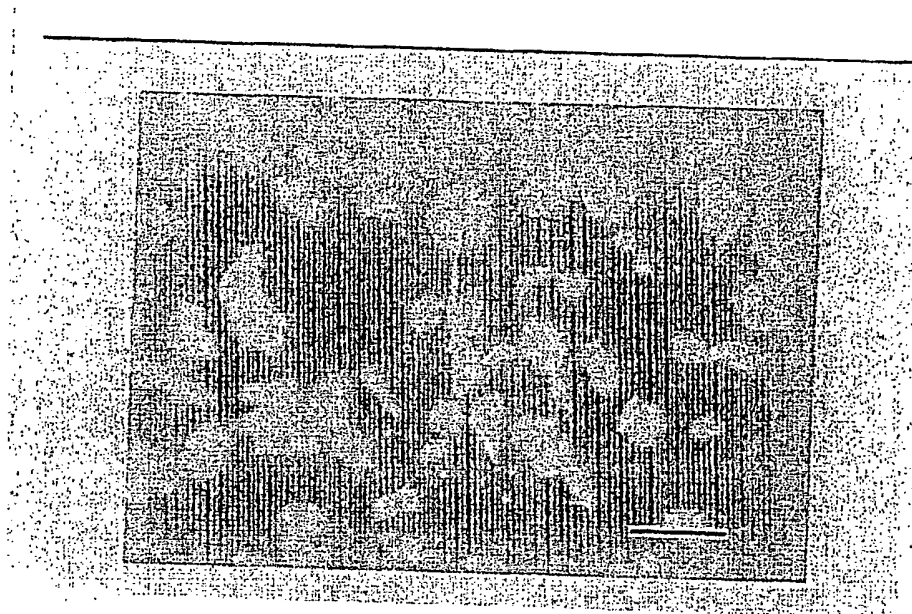




図 15

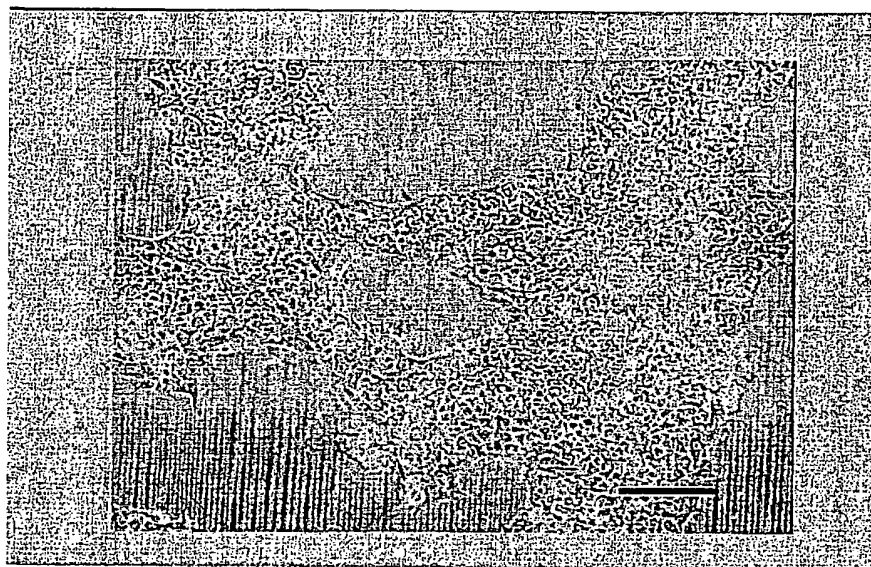




図 16

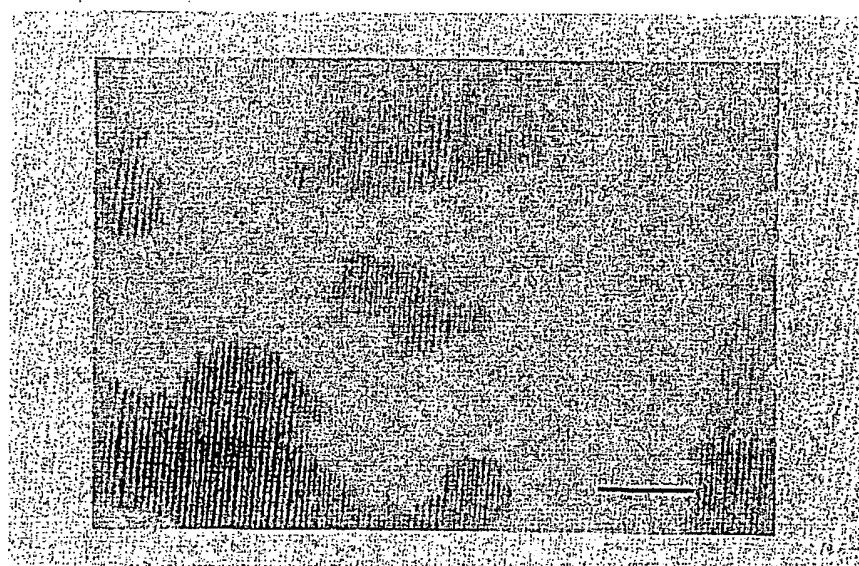
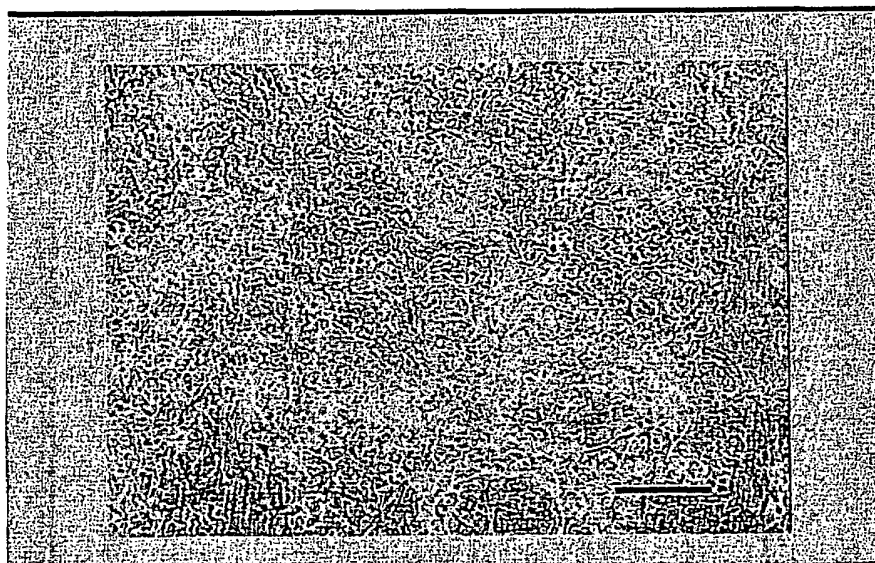




図 17







☒ 18





⊠ 19

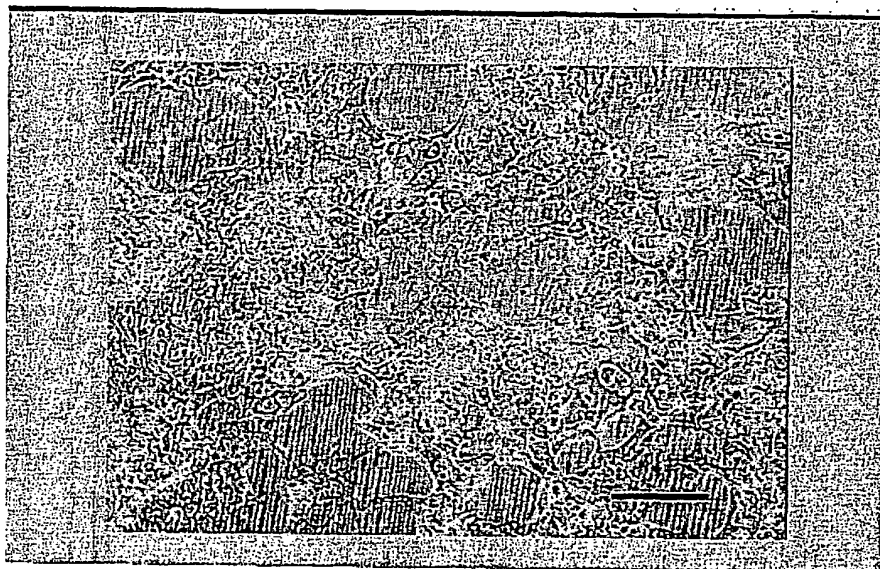
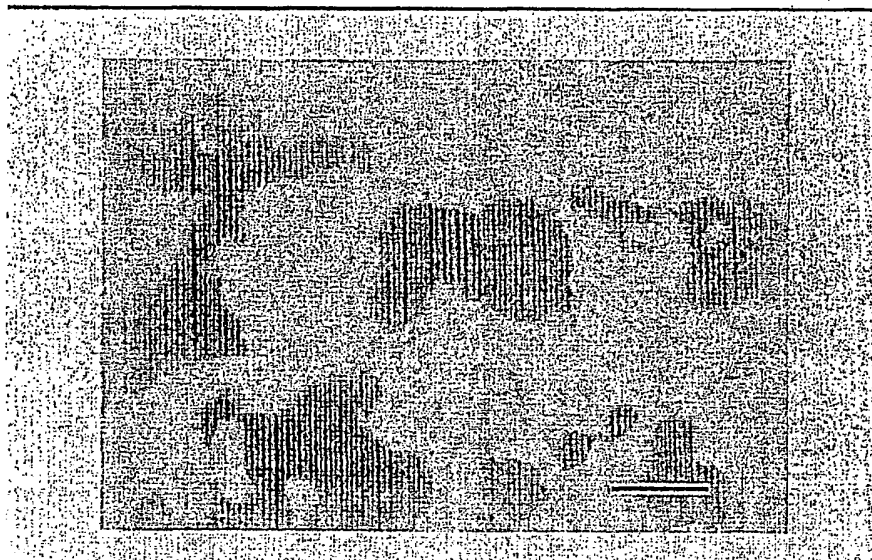




図 20





21

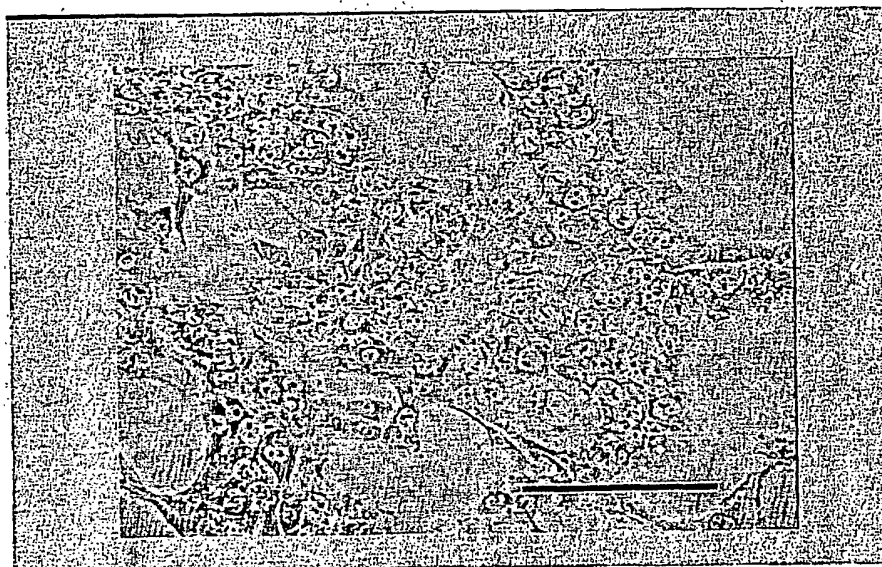
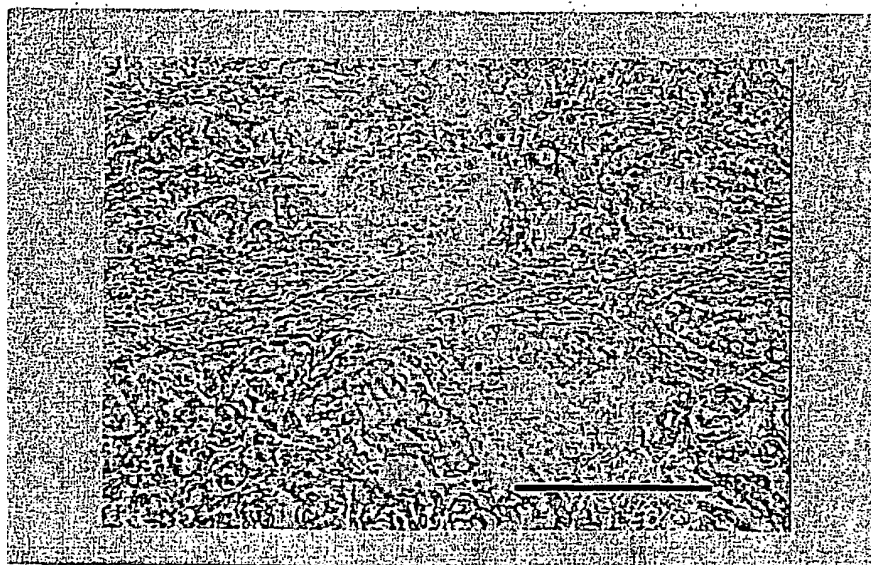






図 22





23

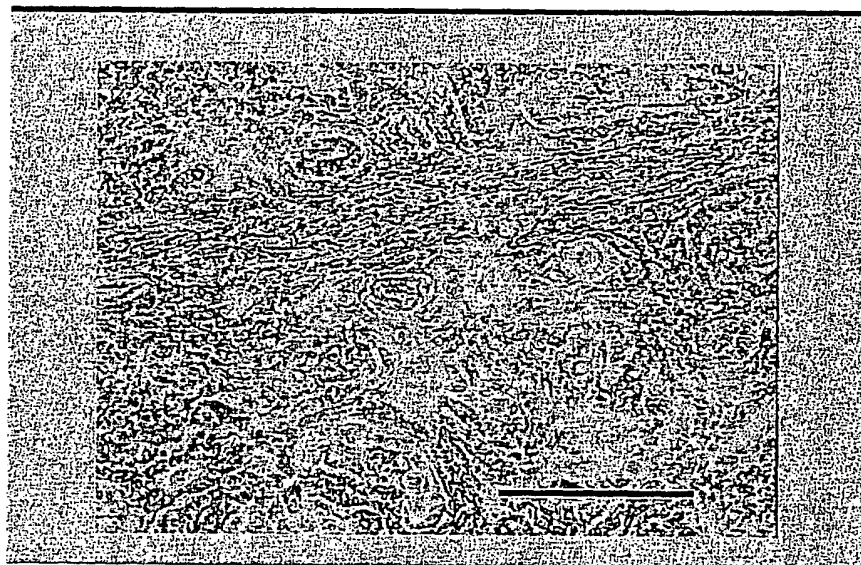
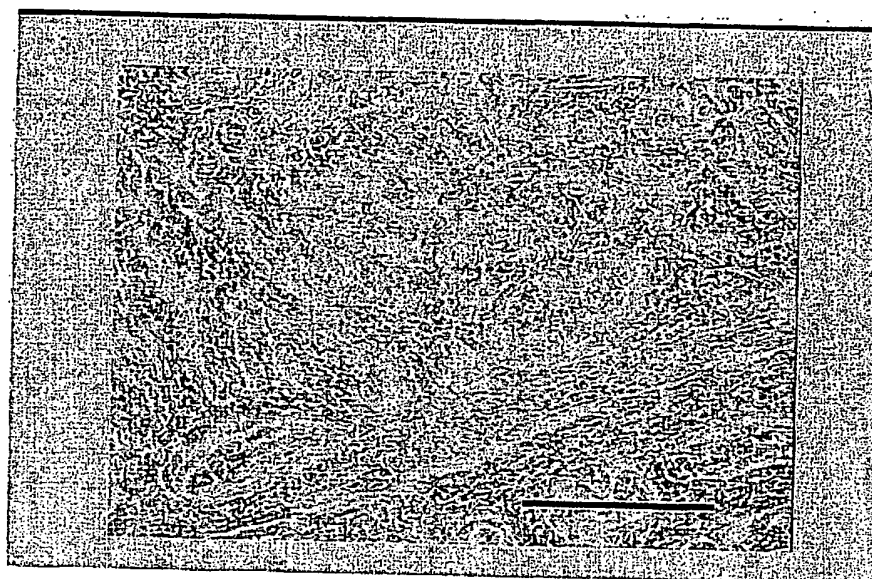


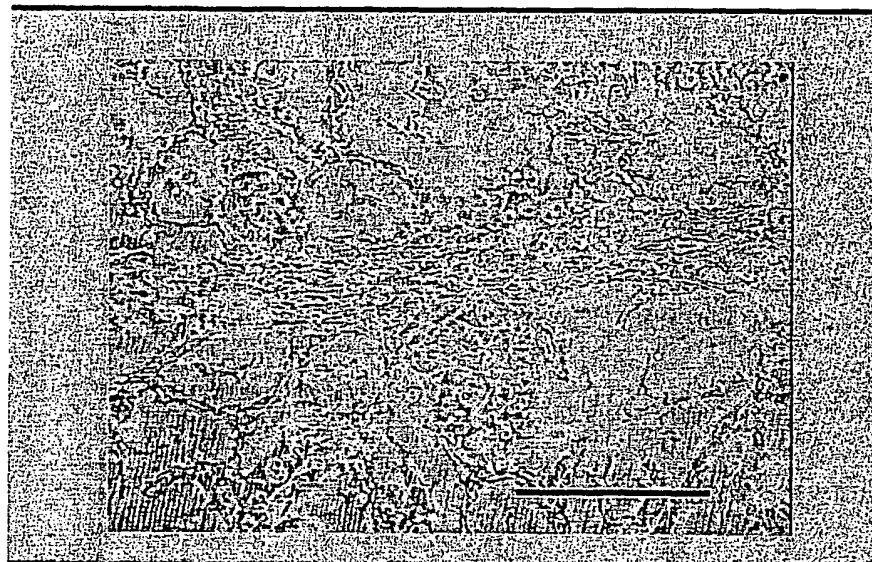


図 24





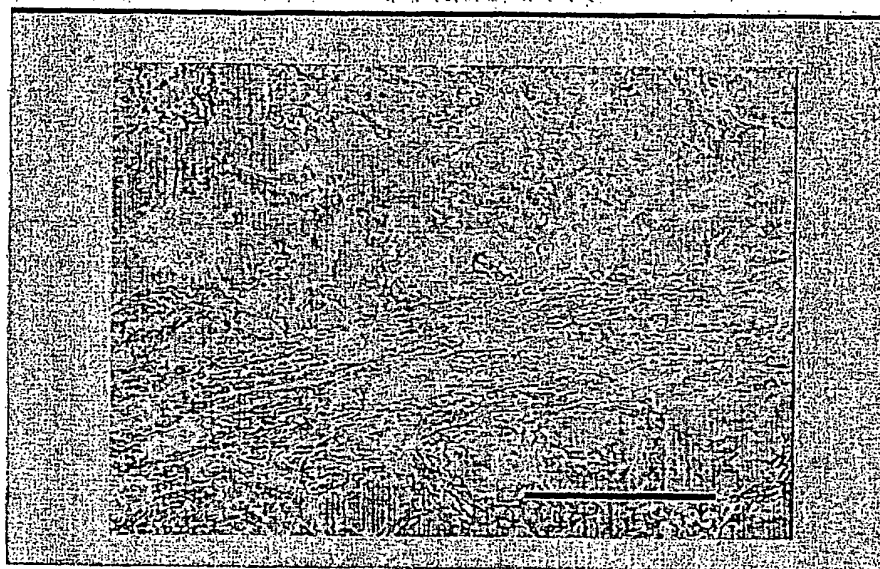
25





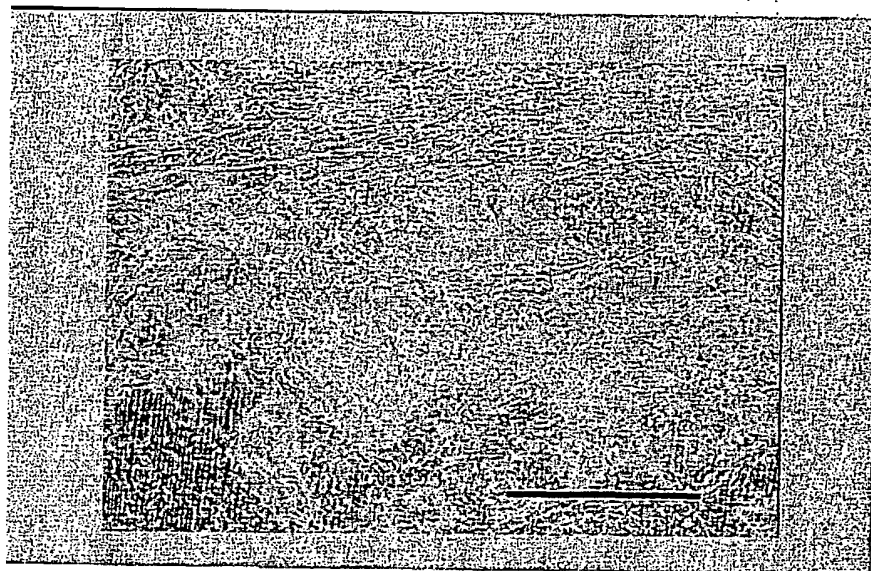


26





☒ 27





☒ 28

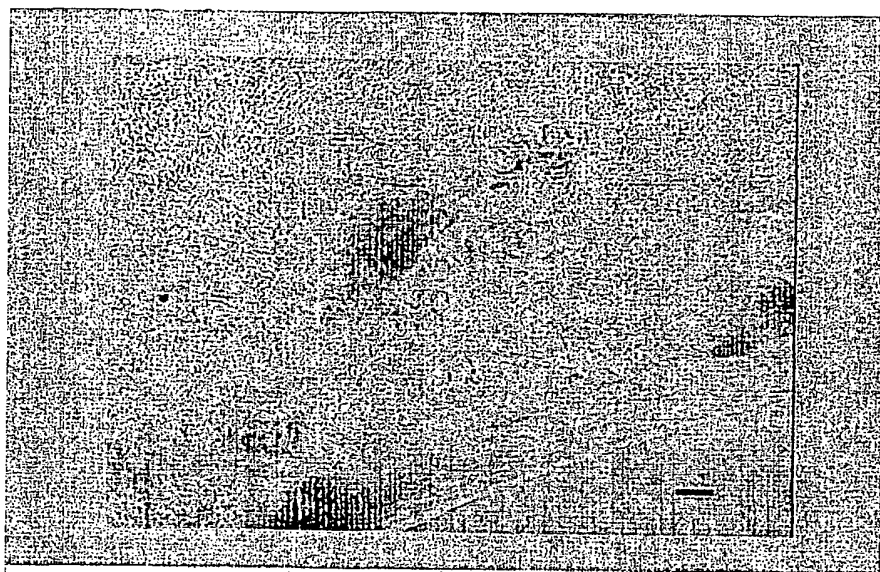
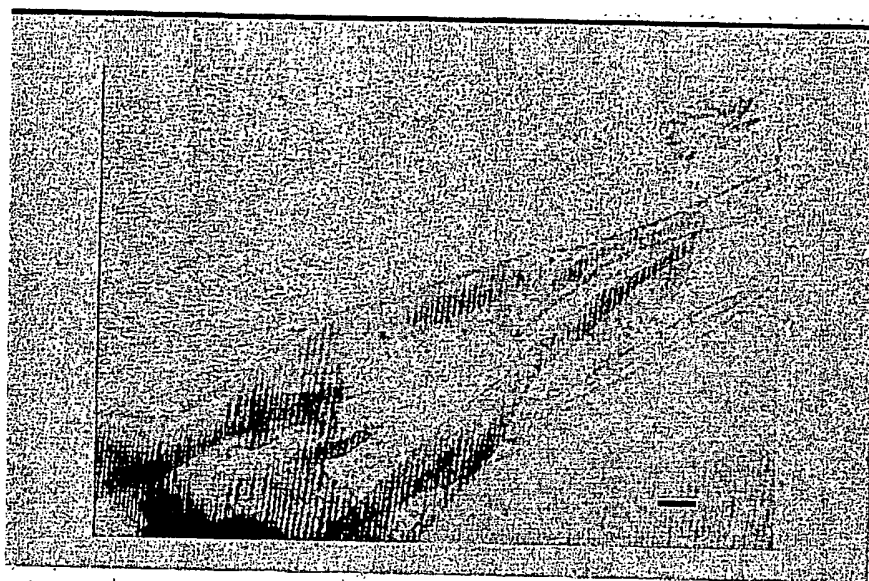




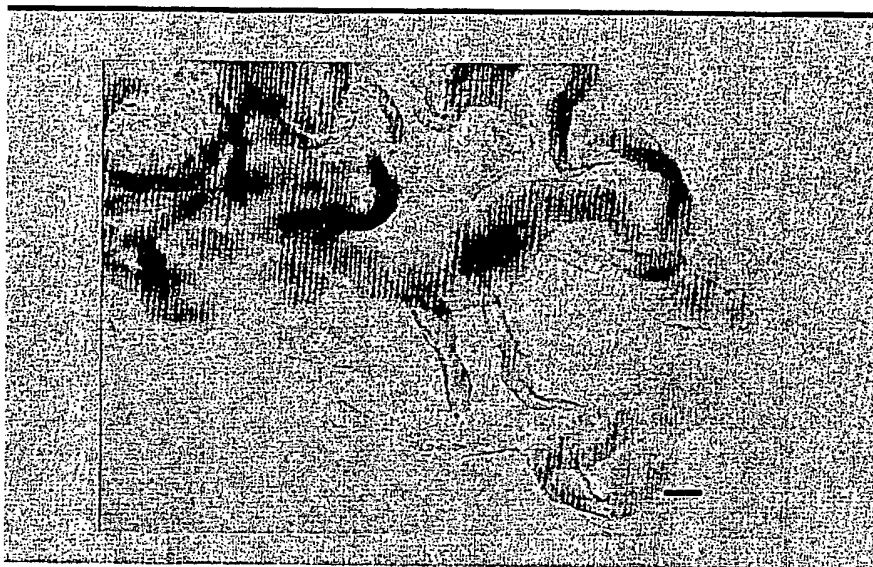
図 29





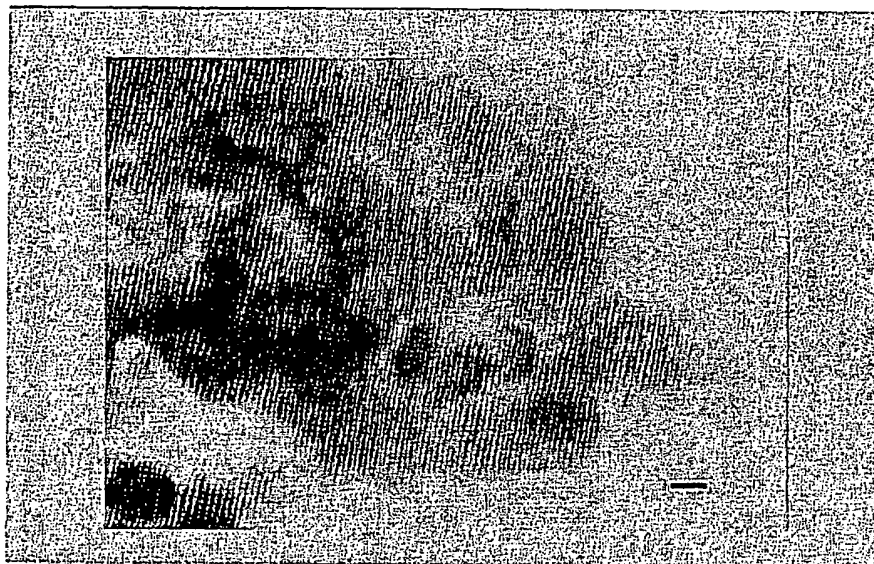


☒ 30



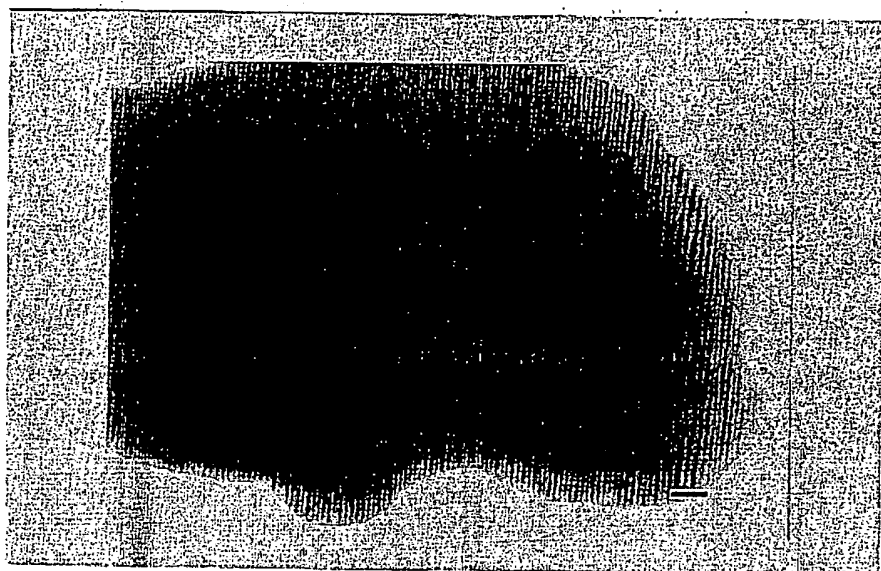


☒ 31





☒ 32





☒ 33

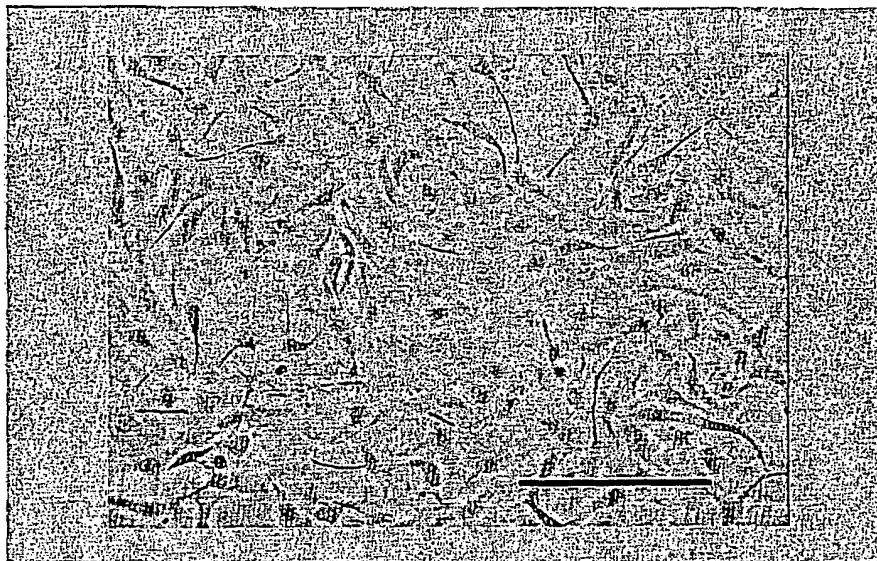






図 34

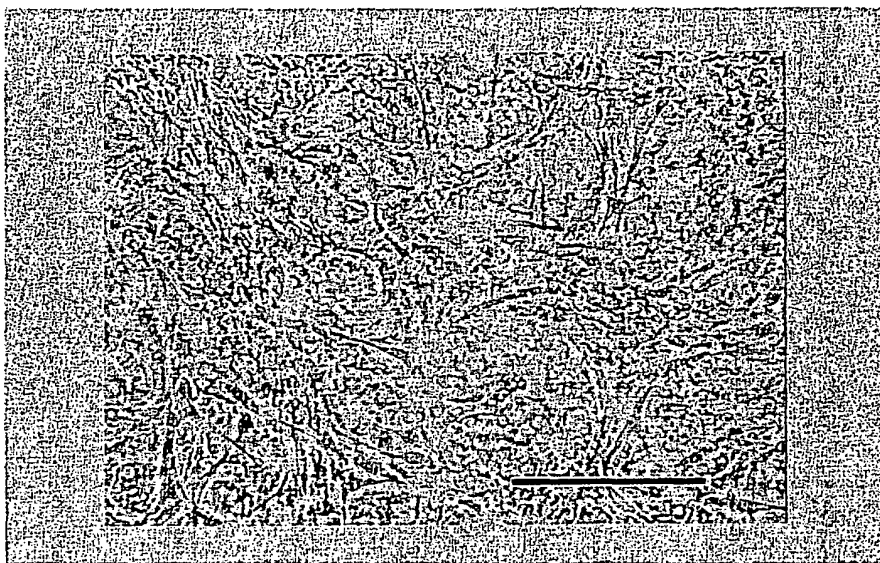




図 35

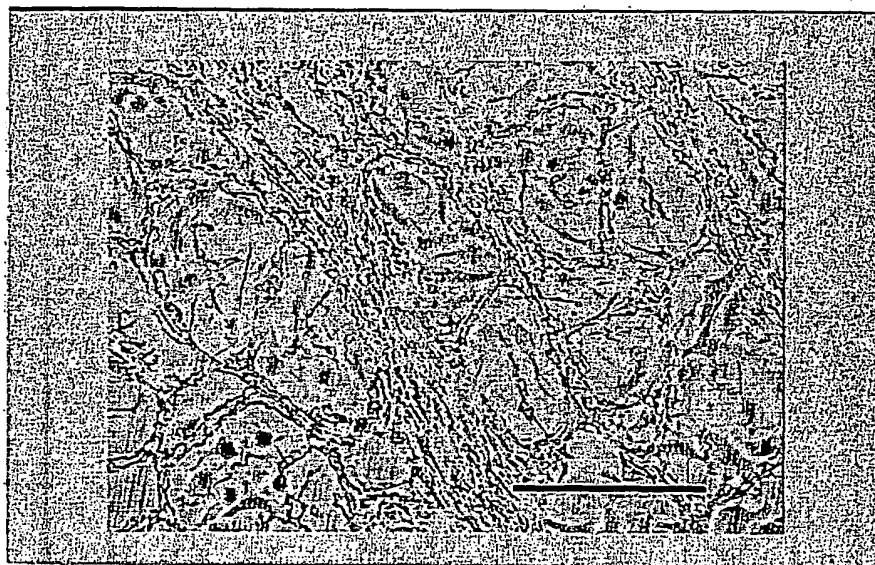
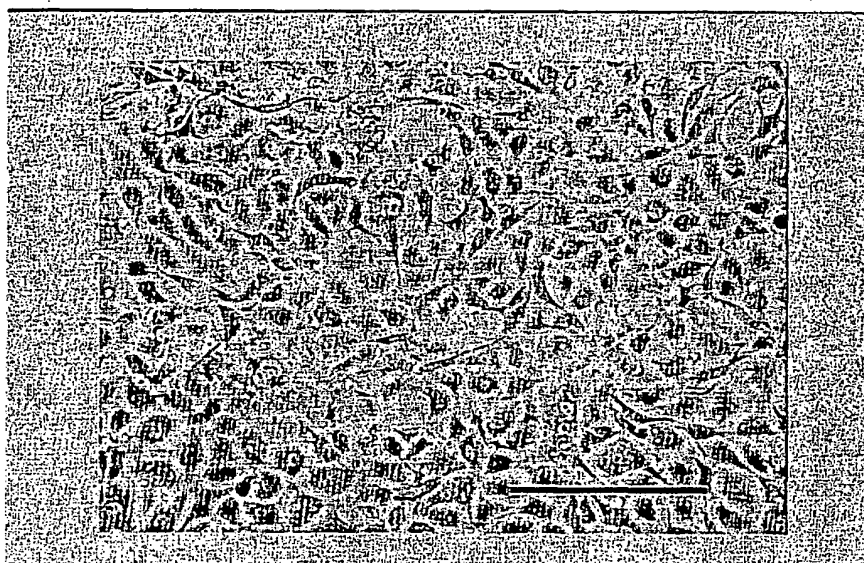


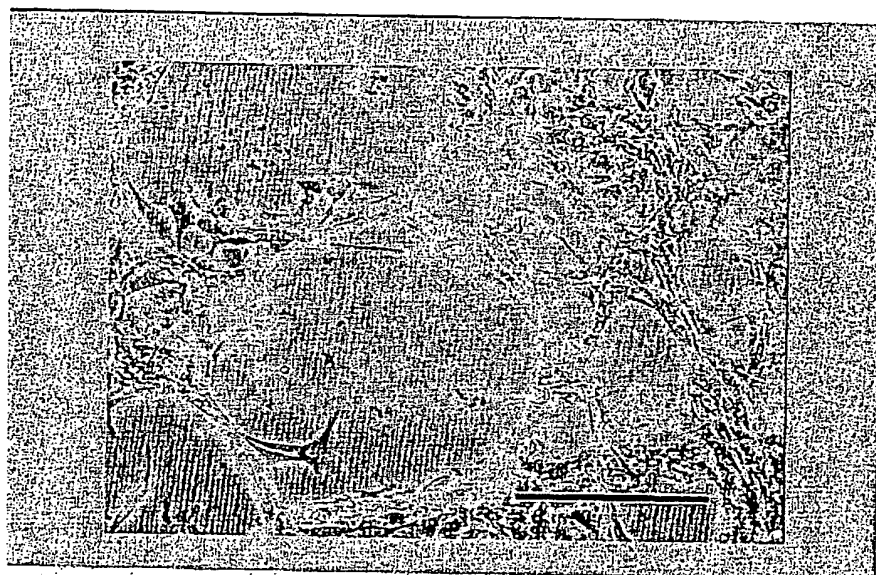


図 36





⊠ 37







☒ 38

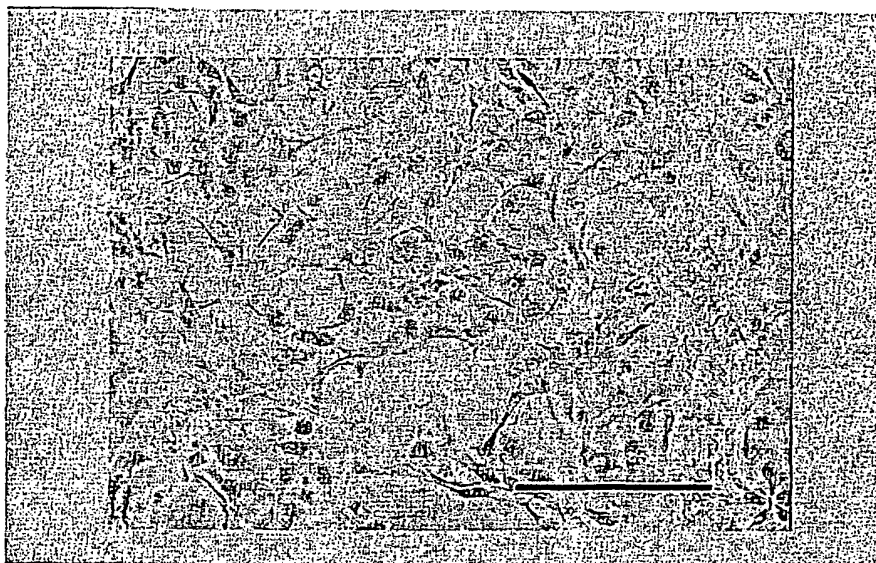
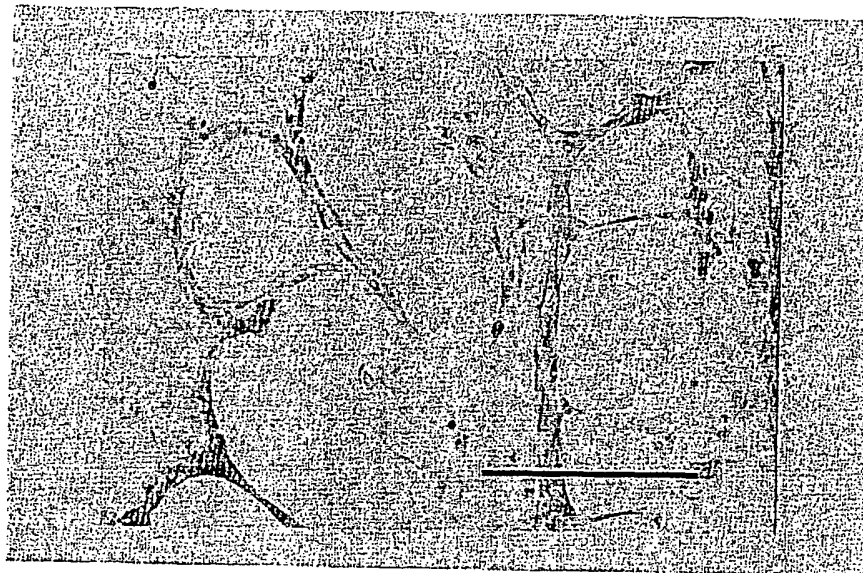


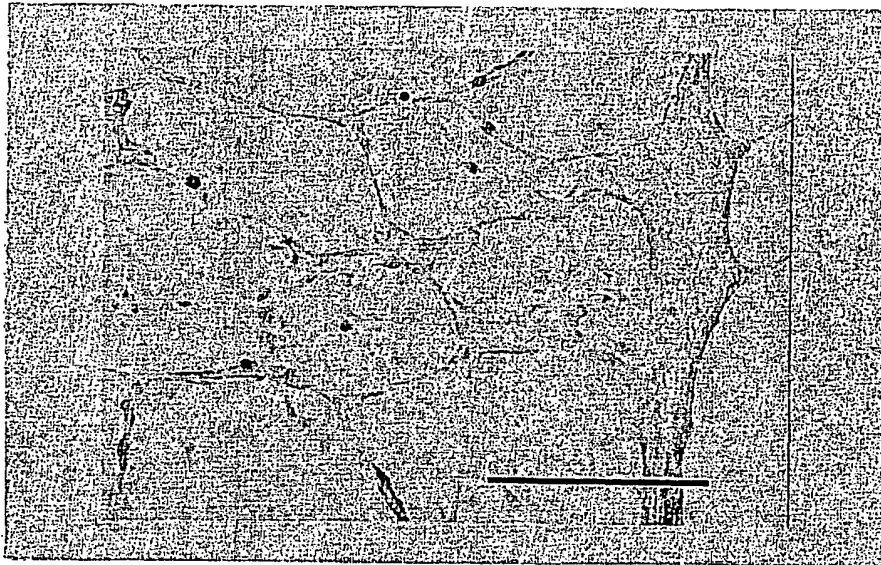


図 39





⊠ 40





⊠ 41

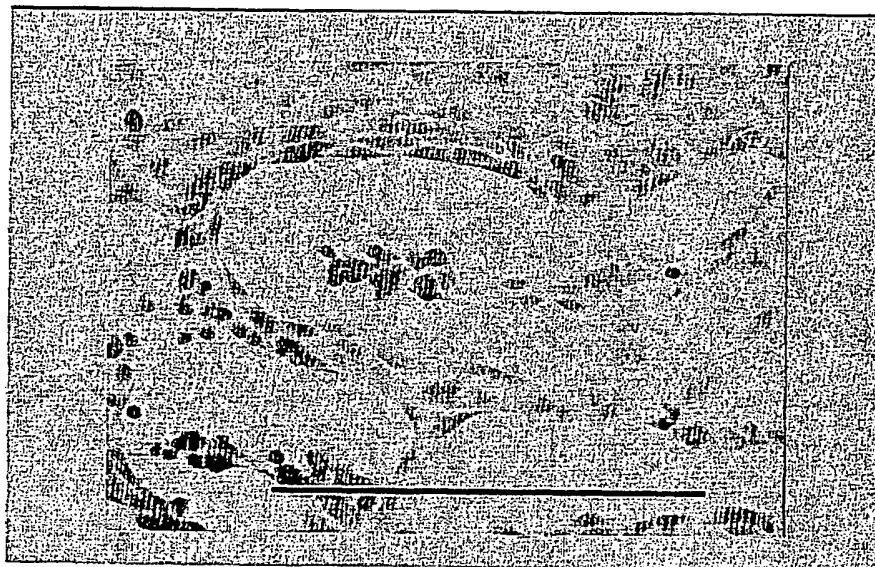






図 42

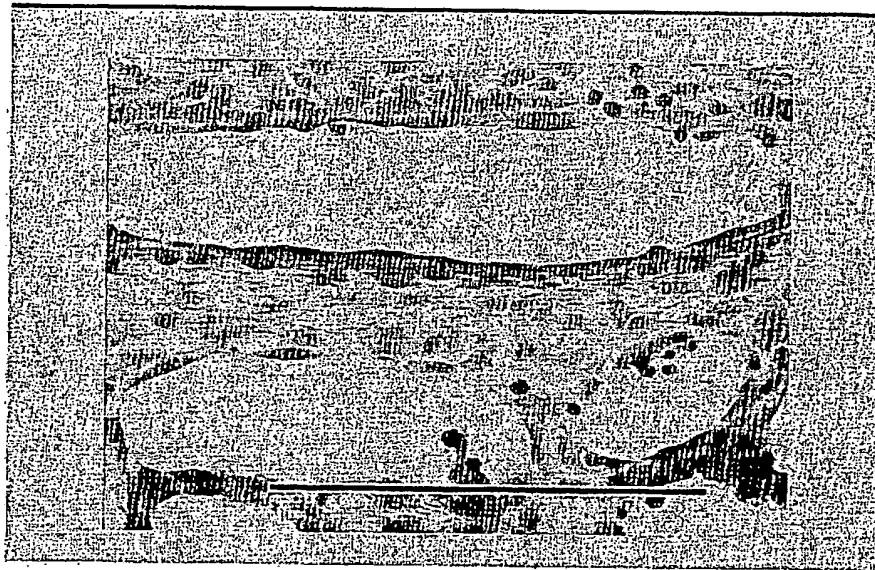
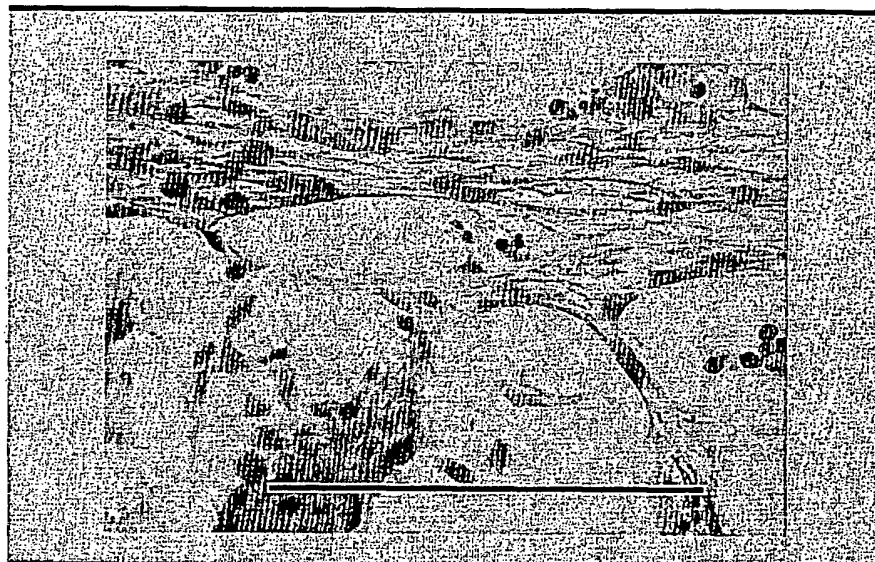


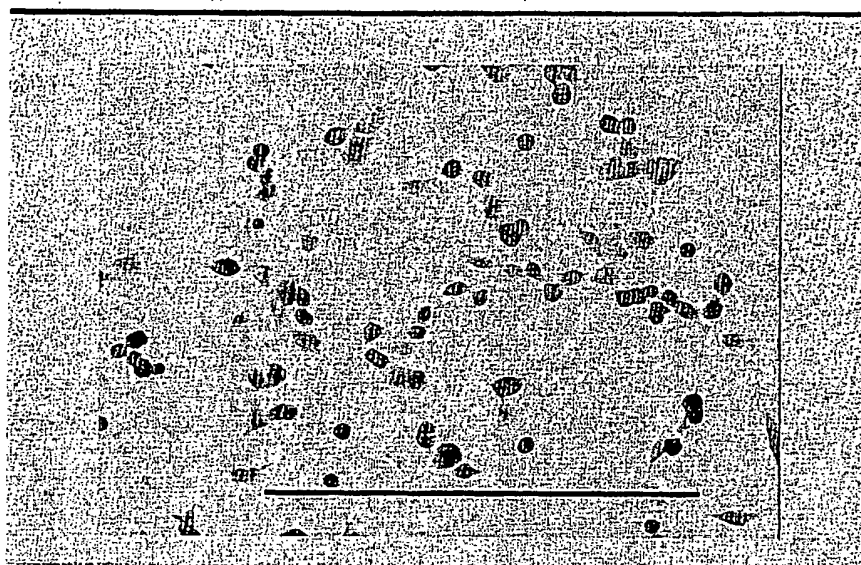


図 43



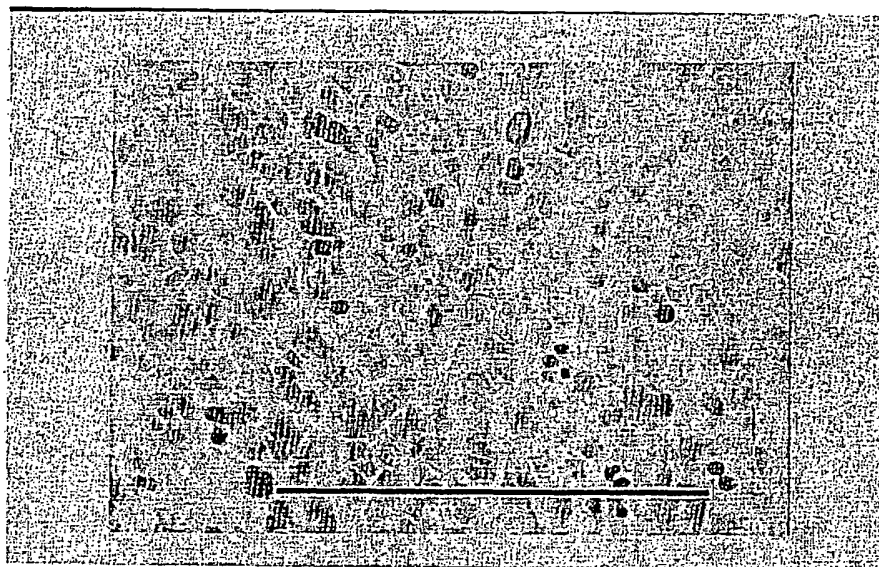


⊠ 44





☒ 45







⊠ 46

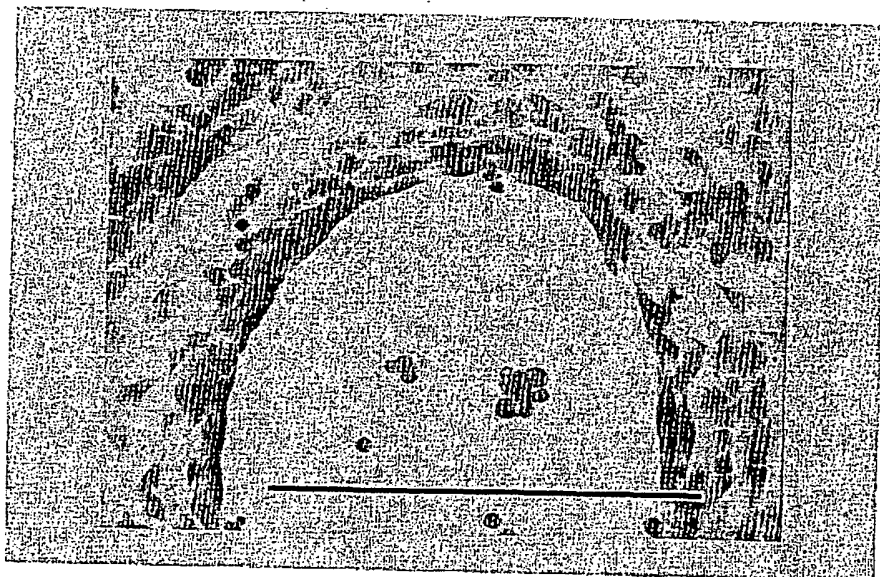
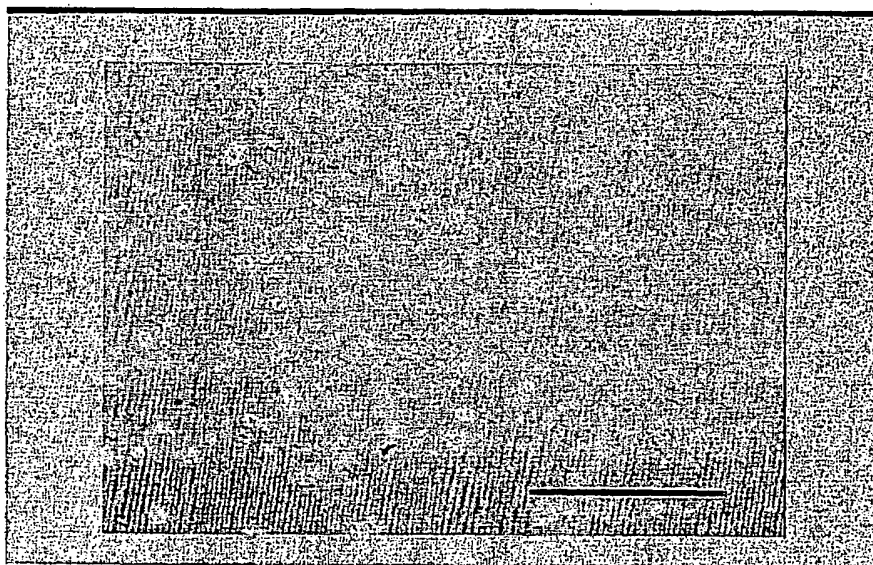


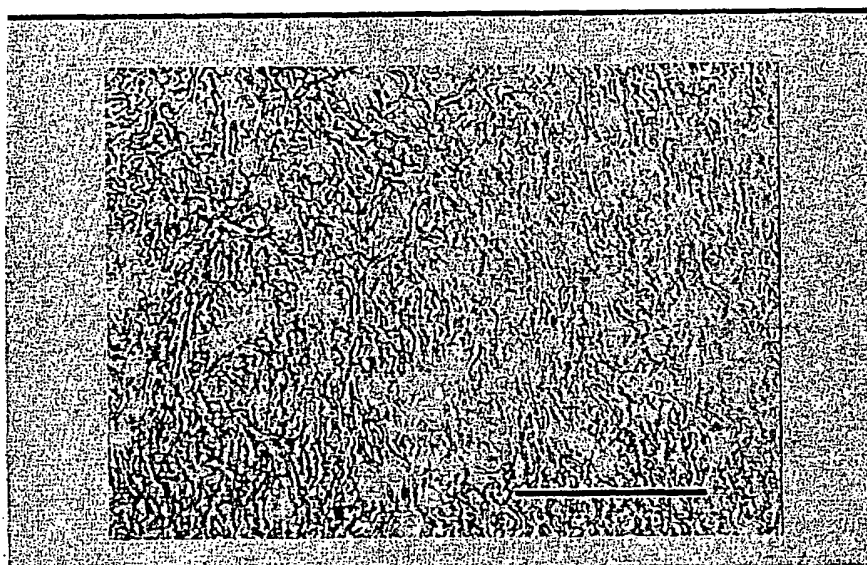


図 47



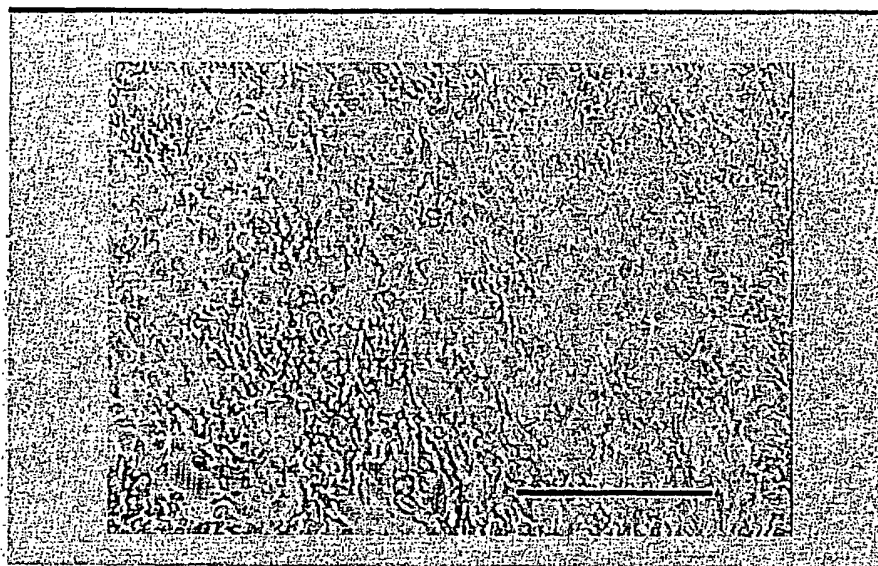


⊠ 48





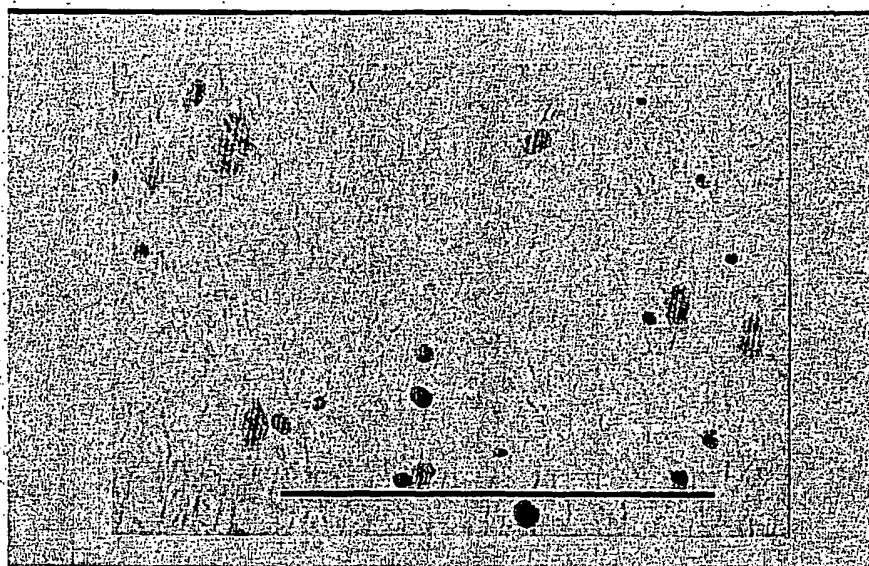
⊠ 49





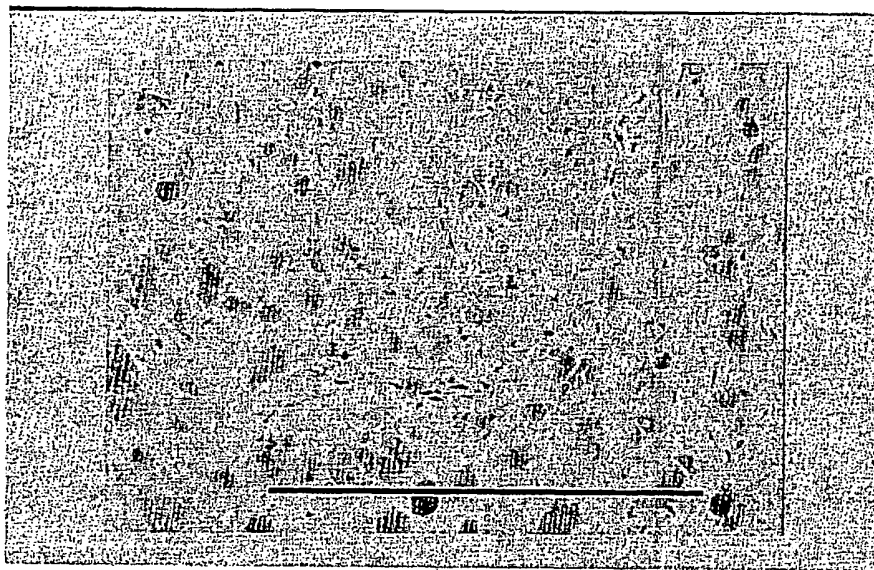


☒ 50





☒ 51





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02859

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12M3/00, C12N5/06, C12N11/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12M3/00~3/06, C12N5/06, C12N11/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Takahiro Mori et al., "Parenchymal cells proliferate and differentiate in an organotypic slice culture of the neonatal liver", Anatomy and Embryology, Vol.199, No.4, pages 319 to 327, (1999)	1-23
Y	WO, 90/2796, A1 (Marrow-Tech Inc.), 22 March, 1990 (22.03.90), & AU, 8942114, A & US, 5032508, A & DK, 9100405, A	1-23
A	JP, 9-154567, A (Nippon Telegr. & Teleph. Corp. <NTT>), 17 June, 1997 (17.06.97) (Family: none)	1-23

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 June, 2001 (15.06.01)

Date of mailing of the international search report  
26 June, 2001 (26.06.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C12M3/00, C12N5/06, C12N11/16		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C12M3/00~3/06, C12N5/06, C12N11/16		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Takahiro Mori. et al. "parenchymal cells proliferate and differentiate in an organotypic slice culture of the neonatal liver" Anatomy and Embryology, Vol. 199, No. 4, p. 319-327 (1999)	1-23
Y	WO, 90/2796, A1 (MARROW-TECH INC) 22. 3月. 1990 (22. 03. 90) & AU, 8942114, A&US, 5032508, A&DK, 9100405, A	1-23
A	JP, 9-154567, A (日本電信電話株式会社) 17. 6月. 1997 (17. 06. 97) (ファミリーなし)	1-23
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 15. 06. 01	国際調査報告の発送日 26.06.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 恵理子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 8114 印

